

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
ISABELLE TREMBLAY

ÉRYTHROPOÏÉTINE ET FIBRINOLYSE INTRARÉNALE

MAI 1999

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

L'érythropoïétine (Epo) est une hormone endogène qui contrôle la production d'érythrocytes dans l'organisme. Utilisée comme agent dopant, sa contrepartie exogène (rHuEpo) conduit à une augmentation de la disponibilité de l'oxygène et par conséquent à une amélioration du VO_2 max et de la performance physique chez les athlètes d'endurance. Ce type de dopage est interdit par le comité international olympique (CIO) depuis 1990. Le problème qui se pose avec la rHuEpo, est qu'il n'existe aucune méthode de dépistage de cette hormone au niveau de l'urine, la seule matrice autorisée par le CIO. Pour essayer de trouver une méthode de dépistage efficace, notre équipe a tenté de mettre en évidence des marqueurs secondaires du dopage à la rHuEpo. Les travaux réalisés par l'équipe ont permis de mettre en évidence une augmentation d'un marqueur secondaire, les produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine dans l'urine ou TDP urinaires. Nos études précédentes se sont donc orientées vers diverses hypothèses pouvant expliquer l'origine de ces TDP urinaires retrouvés en présence d'un possible dopage à la rHuEpo. Les travaux précédents ont permis de poser l'hypothèse que les TDP urinaires pouvaient provenir d'une production intrarénale suite à une modification des enzymes fibrinolytiques. Dans ce mémoire, nous avons donc tenté de vérifier cette hypothèse pour effectivement arriver à l'évidence qu'une augmentation des TDP urinaires était due à une modification de l'uPA (urokinase) et du PAI-1 (inhibiteur des activateurs du plasminogène) étant respectivement un activateur et un inhibiteur de la fibrinolyse.

REMERCIEMENTS

Si j'ai réussi à terminer et à déposer ce mémoire, c'est grâce à l'aide précieuse de plusieurs personnes sur qui j'ai pu compter. J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche le Dr Raynald Gareau pour sa disponibilité, son ouverture d'esprit, sa grande patience et ses nombreux conseils. Je tiens aussi à remercier le Dr Monique Cadrin, ma co-directrice, pour son aide.

J'aimerais également remercier Marie-Guyline Gagnon et Claire Chénard pour leurs conseils pertinents, leur patience et leur amitié. Sans elles, l'atmosphère de travail n'aurait pas été la même. Je tiens aussi à remercier Hélène Hovington qui m'a été d'une aide plus que précieuse.

Finalement, mes derniers remerciements vont à ma famille et à Martin pour leur soutien, leurs encouragements et leur compréhension tout au long de mes études.

Isabelle Tremblay

TABLE DES MATIÈRES

| | PAGE |
|---|------|
| RÉSUMÉ. | ii |
| REMERCIEMENTS. | iii |
| LISTE DES TABLEAUX. | vii |
| LISTE DES FIGURES. | viii |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS. | ix |
| CHAPITRE 1 | |
| GÉNÉRALITÉS. | 1 |
| 1.1 Érythropoïétine. | 1 |
| 1.2 Érythropoïétine et dopage. | 6 |
| 1.3 Dépistage du dopage à l'érythropoïétine. | 8 |
| 1.4 Coagulation, fibrinolyse et rHuEpo. | 12 |
| 1.4.1 Hémostase et coagulation. | 13 |
| 1.4.2 Fibrinolyse. | 16 |
| 1.4.3 Les activateurs du plasminogène. | 18 |
| 1.4.4 Les inhibiteurs de la fibrinolyse | 21 |
| 1.4.5 Fibrinolyse et production des TDP. | 25 |
| 1.4.6 Fibrinolyse et rHuEpo. | 27 |

| | |
|---|----|
| 1.4.7 Fibrinolyse intrarénale | 29 |
| 1.4.8 TDP urinaires et érythropoïétine. | 32 |
| 1.5 Objectifs. | 35 |

CHAPITRE 2

| | |
|--|----|
| MATÉRIELS ET MÉTHODES. | 36 |
| 2.1 Étude de la fibrinolyse intrarénale. | 36 |
| 2.2 Traitement à l'érythropoïétine. | 38 |
| 2.3 Sacrifices et prélèvements. | 39 |
| 2.4 Analyse immunohistochimique. | 40 |
| 2.5 Dosage du PAI-1 par ELISA. | 43 |
| 2.6 Identification du PAI-1 et de l'uPA par immunoempreinte. | 45 |
| 2.7 Statistiques | 51 |

CHAPITRE 3

| | |
|--|----|
| RÉSULTATS. | 52 |
| 3.1 Étude des changements physiologiques suite à un traitement à la rHuEpo. | 52 |
| 3.2 Étude des changements fibrinolytiques intrarénaux par immunofluorescence. | 53 |
| 3.3 Étude des variations du PAI-1 et de l'uPA intrarénales par ELISA | 59 |

| | |
|--|----|
| 3.4 Étude des variations de l'uPA et du PAI-1 intrarénales par immunoempreinte. | 62 |
| CHAPITRE 4 | |
| DISCUSSION ET CONCLUSION | 63 |
| 4.1 Discussion. | 63 |
| 4.2 Conclusion. | 70 |
| RÉFÉRENCES. | 71 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1. Groupes de souris du premier protocole. | 37 |
| Tableau 2. Groupes de souris du deuxième protocole. | 37 |
| Tableau 3. Différences de poids et d'hématocrite chez les souris du premier protocole. | 54 |
| Tableau 4. Différences de poids et d'hématocrite chez les souris du deuxième protocole. | 54 |
| Tableau 5. Analyse immunohistochimique de l'uPA, du PAI-1 et du fibrinogène chez les souris du premier protocole. | 58 |
| Tableau 6. Analyse immunohistochimique de l'uPA, du PAI-1 et du fibrinogène chez les souris du deuxième protocole. | 58 |
| Tableau 7. Concentration de PAI-1 intrarénale chez les souris du deuxième protocole. | 60 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1. Structure tridimensionnelle de la molécule d'érythropoïétine. | 2 |
| Figure 2. Physiologie de l'érythropoïétine. | 5 |
| Figure 3. Production des récepteurs solubles de la transferrine. | 10 |
| Figure 4. Mécanisme de l'hémostase et de la coagulation | 13 |
| Figure 5. Coagulation. Étapes de la formation d'un caillot de fibrine suite à l'activation de la voie intrinsèque ou extrinsèque. | 15 |
| Figure 6. Fibrinolyse | 17 |
| Figure 7. Structure de l'u-PA et du t-PA. | 19 |
| Figure 8. Stimuli des activateurs de la fibrinolyse | 22 |
| Figure 9. Stabilisation de la fibrine | 24 |
| Figure 10. Produits de dégradation de la fibrine. | 26 |
| Figure 11. Néphron. | 30 |
| Figure 12. Structure d'un glomérule. | 31 |
| Figure 13. Photos de glomérules de souris B/W soumis à l'anti-PAI-1 après un traitement de 4 semaines. | 56 |
| Figure 14. Photos de glomérules de souris B/W soumis à l'anti-uPA après un traitement de 4 semaines. | 57 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|--------------------|--|
| BFU-E : | burst forming unit-erythroid |
| BSA : | albumine bovine |
| CFU-E : | colony forming unit-erythroid |
| CIO : | comité international olympique |
| Epo: | érythropoïétine |
| FbDP : | produits de dégradation de la fibrine |
| FgDP : | produits de dégradation du fibrinogène |
| FITC : | fluorescein isothiocyanate |
| HMW-uPA : | urokinase de poids moléculaire élevé |
| IU : | unité internationale |
| kDa : | kilodalton |
| LMW-uPA : | urokinase de faible poids moléculaire |
| PAI-1 : | inhibiteur des activateurs du plasminogène |
| PBS : | tampon phosphate salin |
| PEG : | polyéthylène glycol |
| PGE ₂ : | prostaglandine E ₂ |
| pro-uPA : | précurseur de l'urokinase |
| rHuEpo : | érythropoïétine recombinante humaine |

| | |
|-----------------------|---------------------------------------|
| sTfR : | récepteur soluble de la transferrine |
| t-PA : | activateur tissulaire du plasminogène |
| TDP : | produits de dégradation totaux |
| u-PA : | urokinase |
| VO ₂ max : | consommation maximale d'oxygène |

CHAPITRE 1

GÉNÉRALITÉS

1.1 Érythropoïétine

L'érythropoïétine (Epo) est une hormone glycoprotéique purifiée pour la première fois en 1977 par Miyake et son équipe à partir d'une grande quantité d'urine humaine [1]. Une fois isolée, des chercheurs procédèrent à l'identification de la séquence en acides aminés, et grâce à des sondes ils clonèrent la séquence du gène dans des cellules de mammifères *in vitro* ce qui permit de produire la protéine recombinante en quantité suffisante pour accélérer la recherche au niveau biochimique et clinique [1][2]. On découvrit une chaîne monocaténaire de 165 acides aminés, ayant un poids moléculaire de 18.4 Kd, possédant deux ponts disulfure (Cys 7-161 et Cys 29-33) et quatre sites de glycosylation (Asn 24, Asn 38, Asn 83 et Ser 126) (fig. 1). Selon la forme de l'Epo (alpha ou bêta), la glycosylation de la protéine compte pour 30 à 40 % de son poids moléculaire total. La glycosylation joue un rôle important dans la conformation, la sécrétion, le temps de demi-vie de la molécule et, par conséquent, dans l'activité biologique de l'Epo [2].

L'Epo peut être produite au niveau du foie et des macrophages tissulaires mais c'est surtout au niveau du rein qu'on retrouve l'essentiel de la production de cette hormone glycoprotéique. Les cellules produisant l'Epo au niveau du rein avaient été identifiées en 1988 comme étant une sous- population de cellules

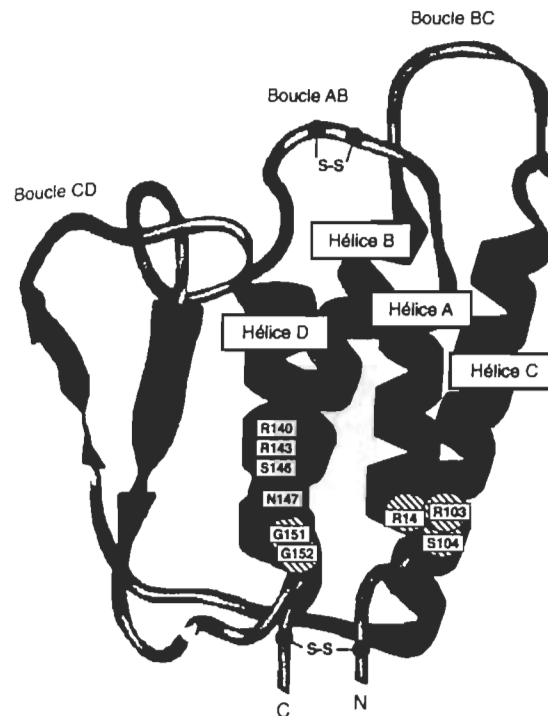


Figure 1. Structure tridimensionnelle de la molécule d'érythropoïétine. (Source : Médecine/Sciences, 1995, volume 11, p.951.)

interstitielles péritubulaires situées dans le cortex et la médullaire externe du rein [3][4][5]. Une étude réalisée en 1996 a cependant identifié une sous-population de cellules tubulaires proximales comme étant responsables de la sécrétion d'Epo [6]. Le rôle principal de l'Epo est de contrôler la production de globules rouges dans

l'organisme. L'Epo n'a aucun effet sur la leucopoïèse mais pourrait avoir un effet sur la mégacaryopoïèse selon certains auteurs [2][7]. Il existe une régulation très étroite et très stricte entre la quantité d'oxygène délivrée aux tissus, la concentration d'Epo sérique et le nombre de globules rouges circulants. En cas d'hypoxie tissulaire, la synthèse d'Epo augmente ainsi que la production d'érythrocytes. Il est évident que c'est l'hypoxie tissulaire qui est le stimulus fondamental de la production d'Epo puisque l'hypoxie entraîne une augmentation de la production de l'ARN messager de l'Epo dans les cellules rénales ce qui entraîne une plus grande production d'Epo à partir des reins [8]. L'hypoxie tissulaire peut être la conséquence de plusieurs événements, soit d'une anémie, d'un séjour en altitude, d'une obstruction pulmonaire chronique, de certaines maladies cardiaques ou d'une hémoglobine de haute affinité (Chesapeake ou Jcapetown) [7]. Ces types d'hémoglobinopathies résultent d'une mutation qui affecte la séquence des acides aminés de l'hémoglobine avec comme conséquence une hémoglobine qui lie avidement l'oxygène provenant des alvéoles mais qui la relâche difficilement aux tissus périphériques. Le rein, qui décèle une hypoxie tissulaire, entraîne une plus grande production d'Epo. Tous les stimuli préalablement énoncés induisent la sécrétion d'Epo et mènent à une polycythémie secondaire sauf pour l'anémie [7].

La régulation de l'Epo rénale est basée sur des capteurs d'oxygène intrarénaux, un mécanisme sensible qui détecte les changements de

concentration d'oxygène dans le sang. Le site cellulaire de ces capteurs d'oxygène n'est pas connu mais de fortes évidences indiquent que c'est dans le rein lui-même qu'ils se trouvent [9]. Une des dernières hypothèses émises implique les cellules épithéliales adjacentes à la membrane basolatérale des tubules proximaux ou un hème stimulerait la synthèse d'Epo par les cellules rénales lorsqu'il serait dans la configuration désoxy [1]. Une autre hypothèse suggère que la synthèse d'Epo surviendrait suite à un langage de prostaglandines E_2 (PGE_2) par les cellules des tubules proximaux en réponse à un apport insuffisant en oxygène [10].

L'Epo agit sur la moelle osseuse en stimulant la différenciation et la prolifération des cellules progénitrices érythropoïétiques (fig. 2). L'Epo stimule la prolifération des cellules CFU-E (colony forming unit erythroid) et des cellules BFU-E (burst forming unit erythroid) via un récepteur d'Epo à leur surface [11]. Ces cellules de la moelle osseuse se transforment en proérythroblastes qui se divisent et mûrissent à leur tour jusqu'aux réticulocytes qui seront expulsés de la moelle osseuse pour rejoindre la circulation. Ceci mène à la formation d'érythrocytes qui se retrouveront en circulation dans le sang périphérique [11][12]. L'effet physiologique de l'Epo, traduit par une augmentation de l'hématocrite survenant environ trois jours après la synthèse d'Epo, est caractérisé, entre autre, par une augmentation du taux de réticulocytes quittant la moelle osseuse à un stade de maturation incomplet. L'Epo endogène fut purifié en 1977 [1] mais il fallut

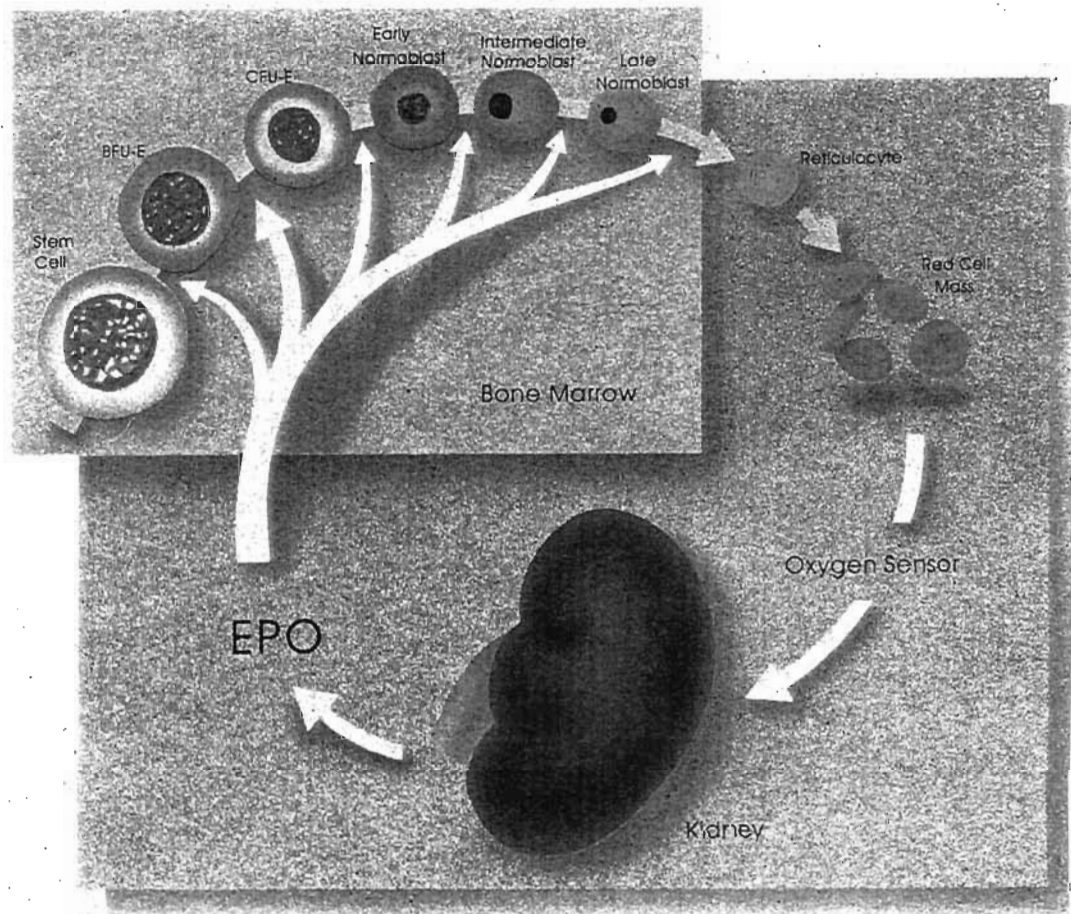


Figure 2. Physiologie de l'érythropoïétine. (Source : dépliant informatif, compagnie Intermedico, NJ , USA, 1995.)

en 1983 pour que le gène de l'Epo soit isolé et cloné [2]. C'est en 1985 que l'Epo humaine recombinante (rHuEpo) fut disponible pour des essais cliniques et quelques années plus tard, elle fut mise sur le marché initialement pour le

traitement de l'anémie, de l'insuffisance rénale chronique et ultérieurement pour les anémies associées à des cancers, au SIDA et au rhumatisme inflammatoire [12][13][14].

1.2 Érythropoïétine et dopage

La mise en marché de la rHuEpo fut reçue avec beaucoup d'enthousiasme de la part des patients et des médecins, cependant d'autres y ont vu un moyen plus qu'intéressant d'augmenter non seulement leur hémocrite mais aussi d'augmenter leurs performances sportives. La rHuEpo devint donc une drogue de choix pour les tricheurs. On se mit à utiliser la rHuEpo comme dopant puisque celle-ci pouvait faire augmenter la VO_2 max (l'aptitude maximale à consommer de l'oxygène). L'augmentation de la concentration d'oxygène dans le sang artériel est un des facteurs qui fait augmenter la VO_2 max [14]. Comme l'oxygène est transportée aux cellules musculaires par les globules rouges, plus il y en a, plus on améliore l'oxygénation périphérique et par conséquent la production d'énergie. La rHuEpo provoque l'accroissement de la capacité de transport de l'oxygène, elle améliore l'endurance, le travail ainsi que le rendement musculaire [14]. La rHuEpo réduit aussi le temps d'adaptation des athlètes aux compétitions en altitude [14]. Les transfusions hétérologues puis autologues et l'entraînement en altitude étaient les méthodes les plus courantes pour faire augmenter l'hémocrite et donc la VO_2 max avant l'arrivée sur le marché de la rHuEpo [14].

La rHuEpo est maintenant une drogue bien connue des athlètes qui semblent utiliser des doses jusqu'à dix fois inférieures à celles prescrites par les médecins aux malades [14]. C'est une substance dopante qui est prisée des athlètes d'endurance comme les cyclistes, les nageurs, les marathoniens, les skieurs de fond et les joueurs de soccer. Cette drogue en est une de choix puisqu'elle procure encore l'avantage d'être indécélable dans l'urine et dans le sang. Son homologie quasi-parfaite avec l'Epo endogène, son court temps de demi-vie dans le plasma (5-11 heures) [12][15][19] et ses manifestations tardives (3-4 jours) [2] font que les athlètes n'ont aucune peur de se faire prendre lors de contrôles en compétition. La rHuEpo fait toutefois partie des substances bannies par le comité international olympique (CIO) depuis 1990 [15] même s'il n'existe encore aucun moyen approuvé de la détecter.

Malgré tous les effets bénéfiques que peuvent en tirer les athlètes, la rHuEpo ne possède pas que des avantages, elle a aussi ses inconvénients. Sur le plan physiologique, la quantité d'oxygène transportée dans le sang n'est qu'un des maillons de la limitation de la consommation d'oxygène. Dans les poumons, tout l'oxygène respiré ne diffuse pas dans le plasma et les érythrocytes. Tout l'oxygène contenu dans le plasma et les érythrocytes n'est pas transféré dans les cellules musculaires et tout l'oxygène véhiculé par le plasma et les érythrocytes n'atteint pas les mitochondries intramusculaires qui produisent l'énergie cellulaire. En outre, l'utilisation de l'Epo de synthèse présente des risques [16]. La viscosité sanguine

augmente de façon exponentielle avec le nombre de globules rouges, avec comme conséquence que la circulation sanguine et le transport de l'oxygène ralentissent et que la quantité d'oxygène mis à la disposition des muscles diminue, résultat inverse de celui recherché. De surcroît, les risques d'obstruction des capillaires (thrombose), d'embolie pulmonaire et cérébrale, de coma, d'hypertension artérielle et de convulsion sont augmentés [16]. Pour prévenir ces risques, les utilisateurs prennent aussi de l'aspirine et des anticoagulants, mais malgré cela, la rHuEpo aurait fait au cours des dix dernières années une trentaine de victimes [16][17][18].

1.3 Dépistage du dopage à l'érythropoïétine

Comme mentionné précédemment, l'Epo recombinante utilisée comme dopage est indétectable dans le sang et l'urine et c'est ce qui en fait une drogue de choix pour les sportifs de haut niveau. Cependant, le défi de trouver des méthodes de détection a stimulé plusieurs équipes de chercheurs à trouver de nouvelles approches permettant de mettre fin à cette pratique illicite.

La mesure de l'hématocrite, du taux circulant de réticulocytes ou de l'hémoglobine ne peut être utilisée pour dépister un dopage à la rHuEpo puisque ces paramètres varient autant sous l'effet d'une augmentation d'Epo endogène que sous l'effet d'une administration d'Epo exogène [15]. La mesure directe de

l'hormone ne peut être utilisée pour dépister le dopage à la rHuEpo car celle-ci possède un temps de demi-vie d'environ cinq à onze heures [12][15][19] et des effets cliniques mesurables trois à quatre jours après son administration. Ainsi, au moment de la compétition il ne reste aucune trace d'Epo exogène dans l'organisme. De plus, l'Epo recombinante présente une homologie quasi parfaite avec sa contrepartie endogène, empêchant pour l'instant toute différenciation entre une augmentation endogène d'Epo et un dopage à cette même hormone.

Suite à ces constatations, l'équipe du Dr Gareau en est venue à chercher d'autres marqueurs sanguins qui pourraient apporter la preuve d'une prise illicite de rHuEpo. La rationnelle développée était que lorsque l'érythropoïèse est stimulée par la rHuEpo, les cellules érythroblastiques deviennent matures pour donner des érythrocytes. Les précurseurs érythrocytaires possèdent à leur surface des récepteurs qui lie la transferrine pour transférer les molécules de fer de cette même transferrine au noyau porphyrinique de l'hémoglobine qui vient d'être synthétisé dans les précurseurs de globules rouges. Avec la maturation des dernières cellules et une fois que les molécules d'hémoglobine sont synthétisées, ces récepteurs de surface ne sont plus nécessaires et les fragments de ces récepteurs sont relargués dans la circulation (Fig.3). La quantification de ces protéines solubles, appelées récepteurs solubles de la transferrine (sTfR), pourrait procurer une indication de l'administration de rHuEpo car ils reflètent indirectement l'effet de l'Epo sur la lignées érythroïde [15]. L'équipe de Dr Gareau

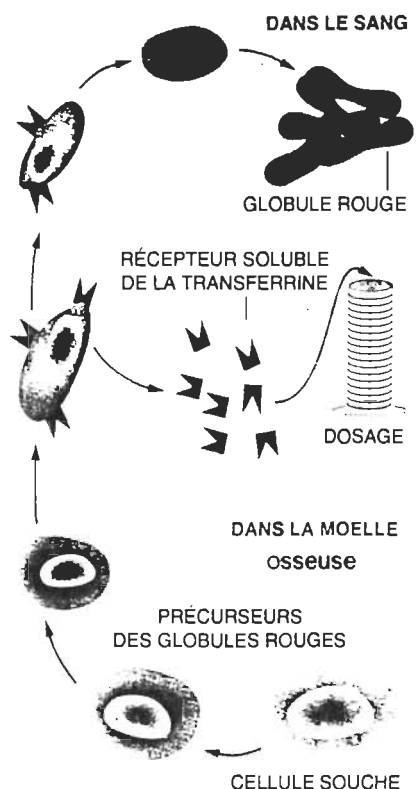


Figure 3. Production des récepteurs solubles de la transferrine. (Source : Pour la science, 1996, no 225, p. 51.)

a réalisé une étude chez des athlètes et des patients hémodialysés en mesurant le taux de sTfR avec et sans prise de rHuEpo. Les résultats obtenus furent très prometteurs car la prise de rHuEpo faisait augmenter le taux de sTfR [20]. Une deuxième étude fût réalisée chez des athlètes recevant de la rHuEpo et les résultats sont venus confirmer les premiers [21]. Cette sonde (sTfR), qui est toujours sous expérimentation, est un pas de géant dans la détection des utilisateurs illicites de rHuEpo. Cependant, il existe un problème majeur à ce

niveau puisque les prises de sang ne sont pas encore admises par le CIO pour le contrôle du dopage chez les athlètes. Comme l'urine est la seule matrice biologique et qu'il est impossible pour l'instant d'y faire une détection directe de la prise de rHuEpo, des travaux réalisés en parallèle par Gareau et al. [22][23][24] se sont orientés vers la recherche de marqueurs secondaires du dopage hormonal dans l'urine. Puisque la rHuEpo en augmentant l'hématocrite peut affecter la viscosité sanguine et par conséquent, entraîner une modification de l'homéostasie vasculaire, leurs recherches ont porté sur l'étude des principales molécules associées à la coagulation et à la fibrinolyse sous administration de rHuEpo. Suite à l'injection de rHuEpo chez des lapins, Gareau et al. ont constaté une variation de la concentration sanguine de deux types de molécules de l'hémostase appelés produits de dégradation du fibrinogène (FgDP) et produits de dégradation de la fibrine (FbDP) rassemblés sous le terme : produits de dégradation totaux (TDP) [22]. Ce constat fût confirmé sur le sang et l'urine de patients suivis en hémodialyse et recevant régulièrement des injections de rHuEpo [23]. L'équipe du Dr Gareau a par la suite analysé l'urine de deux cents athlètes ayant participé à des compétitions internationales dans cinq disciplines [22]. Dix d'entre eux présentaient des taux de TDP anormalement élevés. Les urines de ces suspects ont également été analysées en dehors des compétitions ; leurs taux de TDP était tous redevenu normal [24]. Les résultats de ces études ouvraient enfin une voie de recherche intéressante pour la détection indirecte de la prise de rHuEpo.

D'autres études se sont ensuite poursuivies pour déterminer la provenance des TDP retrouvés dans l'urine des athlètes suspects. Deux hypothèses ont été avancées : soit une origine intra-rénale ou intra-vasculaire. Une étude exploratoire utilisant une technique de perfusion a permis de confirmer que les TDP urinaires observés en présence d'Epo exogène ne proviennent pas d'une filtration rénale augmentée mais proviendraient plutôt d'une modification de la fibrinolyse intra-rénale [25].

1.4 Coagulation, fibrinolyse et rHuEpo

A l'état physiologique normal, il existe un équilibre entre l'hémostase, la coagulation sanguine et la fibrinolyse pour assurer le maintien de la fluidité sanguine et la réparation tissulaire [26]. Un déséquilibre de la part d'un de ces systèmes plasmatiques peut mener, selon le système impliqué, à des complications thrombotiques ou hémorragiques [27]. Dans le cas d'une prise de rHuEpo, cet équilibre est rompu puisque l'hématocrite et les TDP urinaires augmentent chez les athlètes suspectés [24]. Comme les produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (TDP) proviennent de l'activation de ces systèmes plasmatiques, il était important de vérifier la relation existant entre l'augmentation de l'hématocrite, la rHuEpo, les TDP urinaires et ces trois systèmes : l'hémostase, la coagulation et la fibrinolyse.

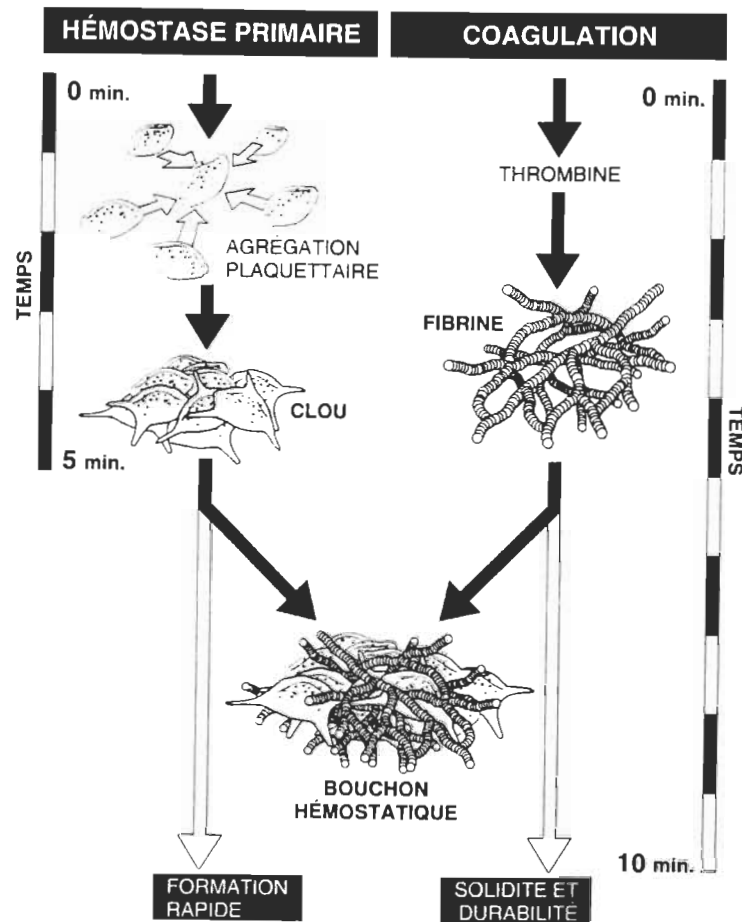


Figure 4. Mécanisme de l'hémostase et de la coagulation. (Source : L'hémostase. François Jobin. Édition Maloine, 1995, p. 6.)

1.4.1 Hémostase et coagulation

L'hémostase est la réaction de défense de l'organisme contre une hémorragie en activité ou imminente. Les réactions d'hémostase commencent dès que des vaisseaux sont rupturés ou lésés. Très succinctement, les réactions d'hémostase ont pour fonctions principales de construire des bouchons

hémostatiques bloquant chaque brèche vasculaire. Le sang, qui s'échappe par ces brèches, apporte les matériaux cellulaires et plasmatiques, c'est à dire principalement les plaquettes et le fibrinogène qui vont constituer le bouchon hémostatique (Fig. 4). Suite à la formation du clou plaquettaire, le système de la coagulation sanguine entre en jeu. La coagulation sanguine se distingue par l'intervention de plus d'une dizaine de protéines plasmatiques de la coagulation qui vont constituer un caillot de fibrine (Fig.5). Les processus enzymatiques de la coagulation sont constitués de deux chaînes de réactions d'activation, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, qui aboutissent à une voie finale commune (Fig. 5). La voie commune débute avec l'enzyme Xa et se termine par la génération de thrombine et de fibrine (Fig.5). La formation de caillots de fibrine peut provenir non seulement de l'hémostase normale mais également d'une réaction d'hypersensibilité retardée ou encore d'une réponse inflammatoire non-spécifique. La viscosité sanguine, dépendant en grande partie de l'hématocrite, est également un facteur pouvant entraîner une activation de la voie intrinsèque de la coagulation. Comme la viscosité est augmentée lors de la prise de rHuEpo, il est possible que cette augmentation puisse entraîner certaines modifications locales conduisant à une agrégation de globules rouges suivi d'une diminution du débit, entraînant la migration des plaquettes vers la paroi et la formation de microthrombi, obstruant les petits vaisseaux sanguins rénaux. Ces microthrombi rénaux pourraient être à l'origine des TDP urinaires trouvés chez les athlètes. De plus, des études ont démontré que les risques de thromboses et d'hypertension étaient accrus chez les patients se faisant traiter à la rHuEpo [49][50][51][52] d'où une

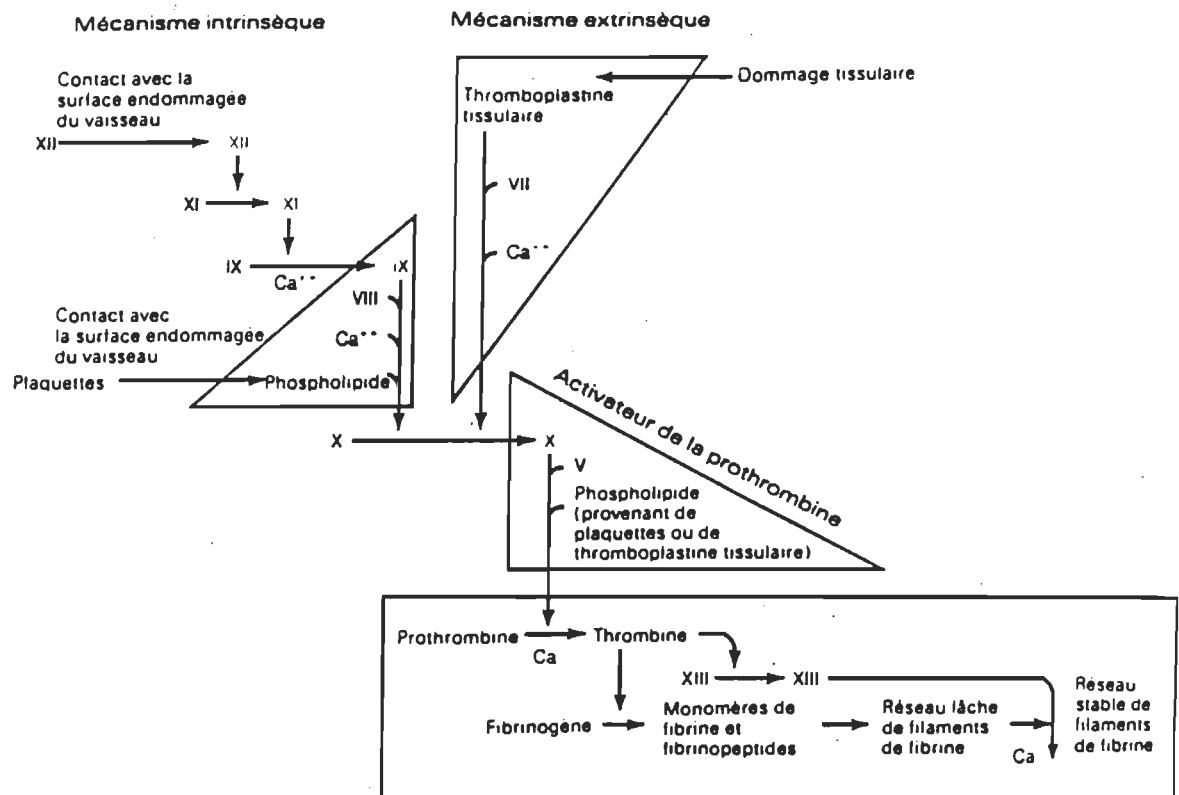


Figure 5. Coagulation. Étapes de la formation d'un caillot de fibrine suite à l'activation de la voie intrinsèque ou extrinsèque. (Source : Anatomie et physiologie par A.P. Spence et E.B. Mason, Édition du renouveau pédagogique, 1983, p. 476.)

une relation possible entre la rHuEpo et la formation de microthrombi rénaux pouvant être à l'origine des TDP. Comme les TDP proviennent de la dégradation

des caillots de fibrine produits lors de la coagulation, il faut aussi déterminer le rôle de la fibrinolyse dans la production des TDP.

1.4.2 Fibrinolyse

La fibrinolyse est un processus actif qui a pour but de débarrasser l'organisme de la fibrine produite lors de la coagulation. Le système fibrinolytique comporte des pro-enzymes, des activateurs, des inhibiteurs et des cascades de réactions biochimiques similaires à celles du système de la coagulation (Fig. 6). L'enzyme clé de la fibrinolyse est la plasmine et son substrat physiologique est la fibrine qu'elle resolubilise par multiples clivages protéolytiques. Les principales molécules impliquées dans ce processus sont le plasminogène, les activateurs du plasminogène (t-PA (activateur tissulaire du plasminogène), l'u-PA (urokinase)) et les inhibiteurs des activateurs (PAI- 1(inhibiteur des activateurs du plasminogène) et l' α 2-antiplasmine)) (Fig.6). L'activation de ce mécanisme survient dès la formation du caillot de fibrine pour en prévenir l'expansion démesurée. Ainsi, quand la coagulation s'amorce, un mécanisme qui servira à la dissolution du caillot est simultanément amorcé [27] (Fig. 6).

La plasmine provient d'une pro-enzyme, le plasminogène, qui est synthétisé par les hépatocytes. Le plasminogène forme la plasmine lorsque son lien Arg 560-

Val 561 est hydrolysé par un activateur du plasminogène. La plasmine formée à partir du plasminogène est produite à proximité de son substrat physiologique, la

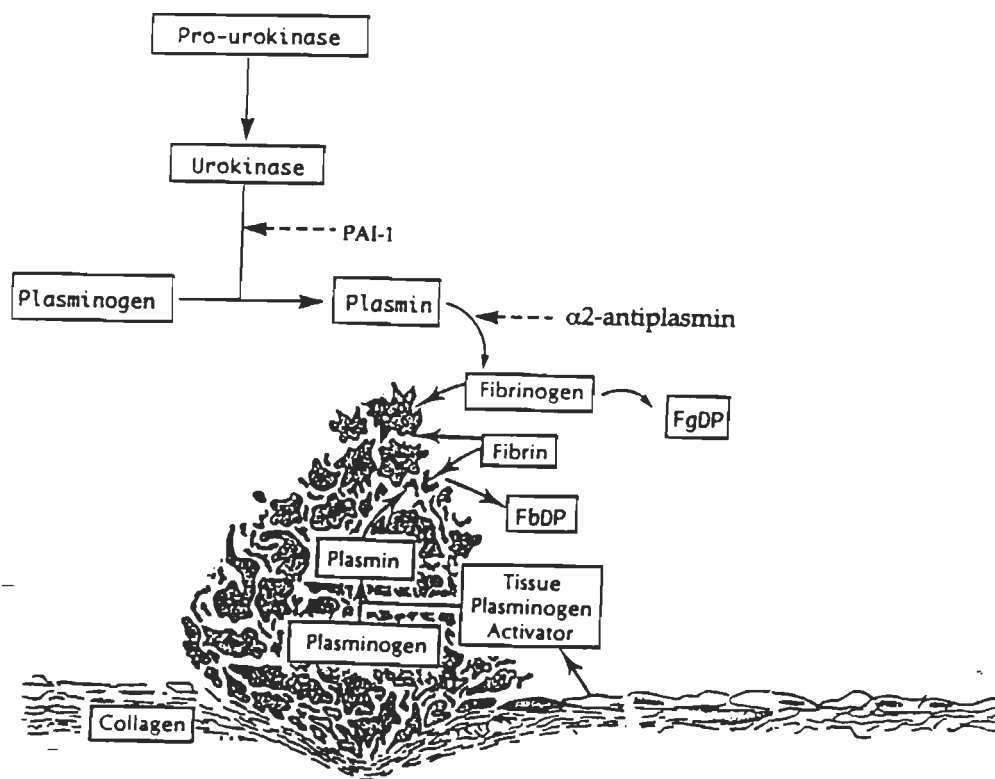


Figure 6. Fibrinolyse. (Source : Mechanisms in blood coagulation, fibrinolysis and the complement system, Torben Halkier, Cambridge University Press, 1991, p. 129.)

fibrine. La plasmine est une endopeptidase qui rompt plusieurs liens peptidiques précis de la fibrine et la fragmente en produits de dégradation progressivement de plus en plus petits (TDP). Ces produits retrouvent leur hydrosolubilité et

reprennent la circulation où ils sont éliminés à distance par le système des histiocytes fixes. Dans le cas des athlètes se dopant à la rHuEpo, les TDP proviendraient des microthrombi rénaux et seraient éliminés en partie ou en totalité dans l'urine.

1.4.3 Les activateurs du plasminogène

Comme la fibrinolyse est sous la dépendance d'activateurs et d'inhibiteurs, il est primordial de cerner le rôle que ces derniers pourraient jouer dans l'augmentation des TDP urinaires retrouvés chez les athlètes. On distingue deux types d'activateurs du plasminogène ; l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'urokinase (u-PA). Le t-PA est une sérine-protéase de 78 Kda composée d'une chaîne polypeptidique simple de 527 acides aminés [29] (Fig.7). Sous l'effet de la plasmine, du facteur Xa, de la trypsine ou de la kallikréine [26], le t-PA peut être converti en une forme bicaténaire par protéolyse limitée du lien Arg-275-Ile-276. Sous condition physiologique, les deux formes, monocaténaire et bicaténaire, sont efficaces à convertir le plasminogène en plasmine. Le t-PA est relargué par les cellules endothéliales en réponse à de nombreux stimuli incluant l'exercice physique intense, le stress, l'angoisse, la chirurgie, la stase veineuse, l'hypoglycémie et de fortes émotions. D'autres stimuli, plutôt biochimiques, peuvent aussi stimuler la sécrétion de t-PA, comme la présence de thrombine, d'épinéphrine, d'adrénaline ou de fibrine [26]. Le t-PA est peu actif en absence de

fibrine car c'est la présence de celle-ci qui provoque une augmentation de plasminogène et en même temps une augmentation de t-PA puisque cette dernière possède une forte affinité pour le plasminogène. L'urokinase est une sérine protéase de 411 acides aminés synthétisée par plusieurs types cellulaires sous forme d'un zymogène (pro-uPA) de 54 KDa de poids moléculaire (Fig. 7). L'activation de la pro-uPA se produit lors

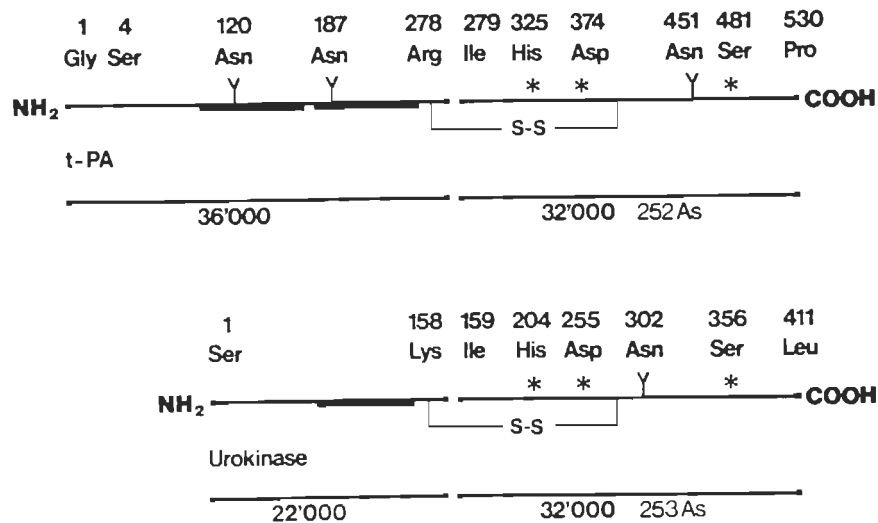


Figure 7. Structure de l'u-PA et du t-PA. (Source : Fibrinolyse et thrombolyse. Édition Masson, 1986, p. 10.)

du clivage du lien Lys-158-Ile-159 par protéolyse limitée. La pro-uPA est activée en présence de plasmine, de kallicréine, du facteur XIIa, de la trypsine, de la cathepsine B et de l'enzyme HUTSP-1 (human T-cell associated serine protease 1)[30]. L'uPA existe sous deux formes de poids moléculaire différent ; l'uPA à haut

poids moléculaire (HMW-uPA) à 54 KDa et l'uPA à bas poids moléculaire (LMW-uPA) à 32 KDa. Les deux formes de l'uPA vont scinder la liaison Arg-560-Val-561 du plasminogène pour donner de la plasmine. L'uPA peut agir sous forme libre dans le plasma ou encore sous forme liée à son récepteur cellulaire présent sur un grand nombre de cellules dont les monocytes, les macrophages et les fibroblastes [31][32][33]. L'uPA selon son état (libre ou lié) aura des effets biologiques différents. L'uPA libre exerce un rôle majeur dans l'activation de la fibrinolyse alors que l'uPA lié à son récepteur est associé à la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire, permettant ainsi la migration cellulaire [33]. Selon les types cellulaires, la synthèse de l'uPA est induite par diverses molécules impliquant la thrombine, le TNF (tumor necrosis factor) et les interleukines [34][35].

Les cellules endothéliales et les plaquettes ne sont pas les seules cellules participant à la fibrinolyse ou à la thrombolyse dans les vaisseaux. Les macrophages activés qui sécrètent l'uPA et les enzymes protéolytiques libérées par les leucocytes ont aussi une activité fibrinolytique. Dans les heures qui suivent la formation d'un bouchon hémostatique ou un thrombus, des substances chimiotactiles (FgDP et D-dimères) s'échappent du thrombus et y attirent promptement monocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles sanguins. Les macrophages adhèrent à la fibronectine et à la fibrine, sécrètent des protéases fibrinolytiques et phagocytent les débris cellulaires et extracellulaires. L'élastase des granulocytes est fibrino(géno)lytique. La prise en charge secondaire de la thrombolyse par les neutrophiles puis par les monocytes, et la

phagocytose croissante constituent probablement un mécanisme majeur et complémentaire de dissolution des thromboses ou bouchons hémostatiques. Cependant, l'intervention des phagocytes est sans doute plus tardive que celle du système fibrinolytique [27]. Les activateurs du plasminogène augmentent lorsqu'il y a production de fibrine, de thrombine et de protéine C activée (fig. 8) pour activer la plasmine à lyser la fibrine. Dans le cas d'athlètes prenant de la rHuEpo, on présume que des microthrombi seraient formés au niveau du rein, donc qu'il y aurait formation de fibrine et ceci entraînerait une augmentation des activateurs de la fibrinolyse. Un dosage des activateurs pourrait ainsi procurer un indice sur l'activité fibrinolytique se passant dans le rein.

1.4.4 Les inhibiteurs de la fibrinolyse

La thrombolyse physiologique intravasculaire est un mécanisme local qui a pour cible un caillot de fibrine local. La génération et l'action de la plasmine doivent demeurer circonscrite sur la fibrine sinon une hyperfibrinolyse plasmatique peut se produire et engendrer des problèmes.

Le premier inhibiteur de la fibrinolyse, l' α -2-antiplasmine, est le principal facteur plasmatique qui confine l'action de la plasmine à la surface de la fibrine. L' α -2-antiplasmine est une glycoprotéine monocaténaire d'un poids moléculaire de

67 KDa synthétisée par les hépatocytes [27]. L' α -2-antiplasmine possède trois caractéristiques fonctionnelles spécifiques : elle inhibe presque instantanément la

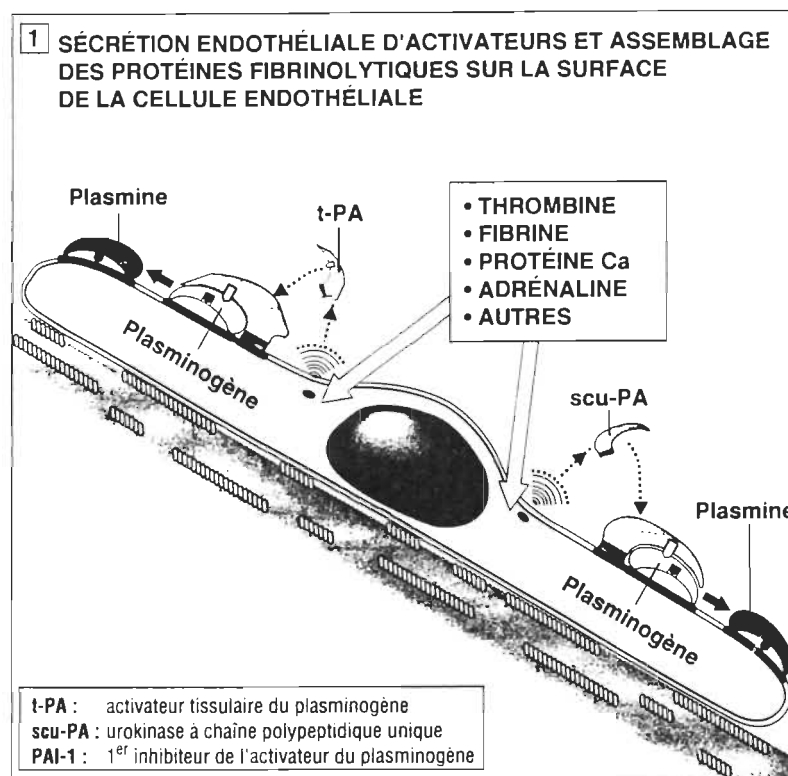


Figure 8. Stimuli des activateurs de la fibrinolyse. (Source : La thrombose. François Jobin. Édition Maloine, 1995, p. 48.)

la plasmine dans un ratio 1 : 1, elle interfère dans l'adsorption du plasminogène à la fibrine et elle fait subir un "crosslinking" (formation d'une liaison covalente) aux chaînes alpha de la fibrine lors de la coagulation [26]. La réaction entre l' α -2-antiplasmine et la plasmine a lieu en deux étapes, la première est une réaction

extrêmement rapide pendant laquelle un complexe réversible entre la plasmine et l'inhibiteur est formé, la deuxième se produit lorsque la sérine du site actif de la plasmine interagit avec une liaison peptidique Leu-Met de l' α -2-antiplasmine pour la formation d'un complexe plasmine - α -2-antiplasmine irréversible. Le deuxième inhibiteur de la fibrinolyse est l'inhibiteur des activateurs du plasminogène (PAI-1). Le PAI-1 est membre de la superfamille des serpinés (inhibiteur des sérines-protéases). C'est une molécule de 52 KDa qui se lie dans un ratio 1 : 1 avec l'uPA et le t-PA [36]. Cet inhibiteur est produit par plusieurs types de cellules incluant les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les hépatocytes. Il existe deux réserves de PAI-1 sanguin : une emmagasinée dans les granules alpha des plaquettes et l'autre circulant dans le plasma [27]. Les plaquettes possèdent 90% des réserves de PAI-1 [27]. La haute concentration de PAI-1 des plaquettes est en conséquence disponible sur le site de formation d'un thrombus. Le PAI-1 se lie à la fibrine pour ensuite aller former des complexes stables avec l'uPA et le t-PA arrêtant ainsi la transformation du plasminogène en plasmine. La balance entre les activateurs et les inhibiteurs est un déterminant critique de la stabilité et de la lyse du thrombus. Un niveau trop élevé de PAI-1 entraîne l'inhibition de la fibrinolyse et en même temps la persistance du thrombus. Le mécanisme de régulation de la sécrétion du PAI-1 dans le plasma par différents types cellulaires est présentement mal connu. Il a été démontré que les cellules endothéliales sont capables d'augmenter la production de PAI-1 lors d'une stimulation par des lipopolysaccharides ou certaines cytokines [37].

Plusieurs études ont associé une augmentation de PAI-1 à divers problèmes vasculaires. Une études a révélé que 30 à 40 % des patients ayant une

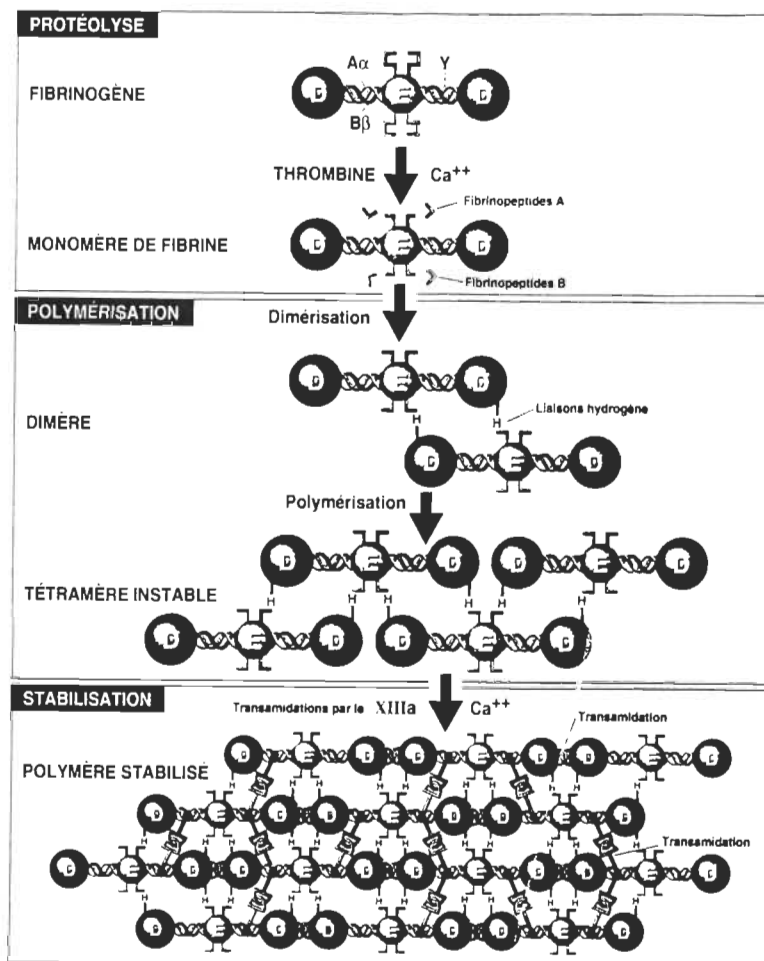


Figure 9. Stabilisation de la fibrine. (Source : La thrombose. François Jobin. Édition Maloine, 1995, p. 65.)

thrombose veineuse profonde ont une activité fibrinolytique diminuée due principalement à une augmentation de la sécrétion de PAI-1 dans le plasma [37].

D'autres études faites sur des souris transgéniques sans gène pour le PAI-1 ont révélé que l'absence de PAI-1 diminue la résistance d'un thrombus et augmente l'activité fibrinolytique [38][39]. D'autres souris transgéniques, mais cette fois avec le gène du PAI-1 humain en surplus, ont démontré une accumulation de PAI-1 dans les tissus et dans la circulation avec apparition de thrombose peu après la naissance [37][40]. Une étude sur des souris sans le gène de l'uPA et du t-PA a démontré que les souris souffraient d'un dépôt généralisé de fibrine [37]. Une étude histochimique avec coloration du thrombus en est venue à l'évidence d'une augmentation de PAI-1 associée avec le dépôt de fibrine [41]. Finalement, plusieurs d'études identifient le PAI-1 comme jouant un rôle majeur dans la persistance des dépôts de fibrine dans le rein durant des conditions pathologiques [40][42][43][44][45][46][47][48]. Suite à ces évidences, nous croyons que la mesure des inhibiteurs, principalement ceux du PAI-1, pourrait donner des renseignements importants sur l'activité fibrinolytique intrarénale suite à une prise de rHuEpo.

1.4.5 Fibrinolyse et production des TDP

Il est possible aujourd'hui de préciser le mécanisme de la fibrinolyse. En effet, la fibrine stabilisée est constituée de protofibrilles à deux brins formées chacune de deux polymères linéaires disposés parallèlement et liés l'un à l'autre (Fig.9). Chaque polymère linéaire est le fruit de la polymérisation bout à bout de monomères de fibrine. Chacun de ces monomères est constitué d'un domaine E

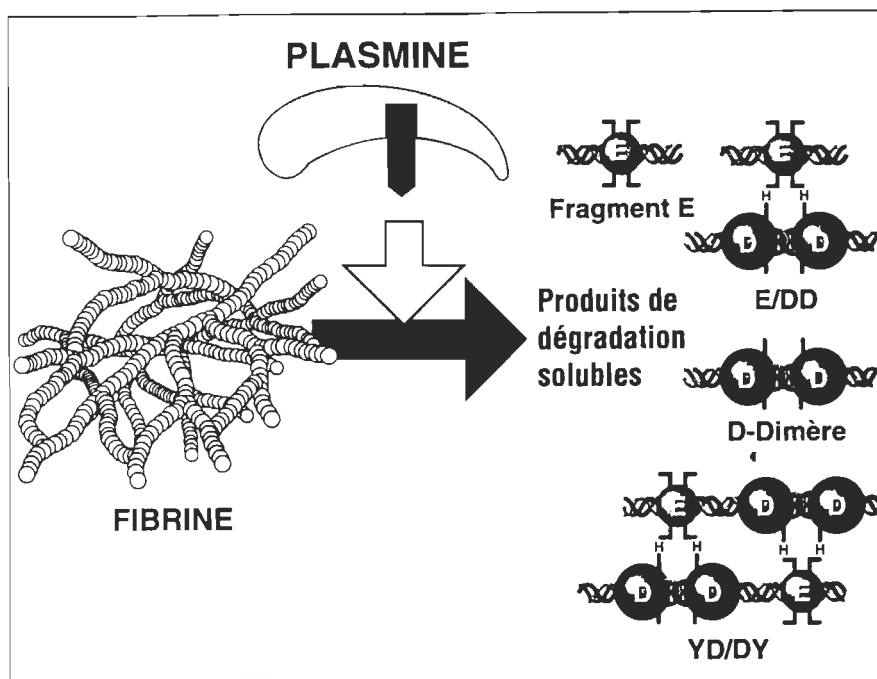


Figure 10. Produits de dégradation de la fibrine. (Source : La thrombose. François Jobin. Édition Maloine, 1995, p. 45.)

en son centre et d'un domaine D à chacune de ses extrémités. Le facteur XIIIa stabilise le polymère de fibrine en créant des liens covalents (réaction de transamidation) entre les domaines D adjacents de deux monomères et entre les chaînes polypeptidiques des deux polymères accolés l'un à l'autre. Ces deux polymères linéaires, qui sont côte à côte, sont décalés l'un par rapport à l'autre. Le

domaine E de l'un étant vis à vis du dimère D-D (jonction de deux monomères) de l'autre. La figure 10 illustre la composition des fragments les plus petits (et les plus tardifs) qui sont la conséquence des clivages protéolytiques successifs de la plasmine sur la fibrine stabilisée (FbDP). Le produit final ou le plus dégradé, appelé D-dimère, est associé ou non par des liaisons hydrogène au fragment E (complexe DD ou DD/E) ; il est spécifique de l'action de la plasmine sur la fibrine par opposition de la dégradation du fibrinogène. En absence de fibrine, la plasmine peut également dégrader le fibrinogène (fibrinogénolyse) et former des produits de dégradation du fibrinogène (FgDP). Dans des conditions physiologiques, la formation de FgDP est extrêmement rare car toute plasmine s'échappant du caillot est rapidement captée par des inhibiteurs. L'ensemble des produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine constitue les produits de dégradation totaux (TDP). Les différents fragments de TDP produits lors de la dégradation d'un caillot de fibrine possèdent des poids moléculaires variant de 50 à 440 Kda.

1.4.6 Fibrinolyse et rHuEpo

Considérant les risques de thromboses et d'hypertension associés à l'utilisation de l'Epo exogène [49][50][51][52], plusieurs études effectuées chez des sujets sains et des sujets hémodialysés recevant cette hormone ont voulu démontrer son effet sur la synthèse des molécules fibrinolytiques. Selon certaines études, un traitement à faible dose ne semble pas affecter les fonctions

fibrinolytiques [53][54]. De plus, un traitement de hautes doses à court terme n'a pas d'effet clinique sur l'hémostase, la fibrinolyse et la rhéologie du sang [55]. Cependant, plusieurs études ont démontré des changements dans le système hémostatique et fibrinolytique avec augmentation de D-dimères [22][23][51][52]. Une dernière étude a observé une augmentation de PAI-1 chez des patients ayant une thrombose suite à l'administration de rHuEpo, mais le petit nombre de patient rendait difficile toute conclusion [52]. En dépit de certains résultats contradictoires, la rHuEpo semble affecter la fibrinolyse plasmatique et c'est ce point que nous allons tenter d'approfondir.

L'exercice est aussi un facteur qui peut faire varier les systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse. C'est pourquoi plusieurs études ont tenté de faire la lumière sur ce facteur. Il a été établi par plusieurs études qu'une activité physique intense peut faire augmenter jusqu'à dix fois l'activité fibrinolytique du sang [56][57]. L'augmentation de cette activité fibrinolytique est attribuée à une augmentation de la concentration d'uPA [58], de t-PA [56][59][60] et de plasminogène [59][60] mais aussi à une diminution du PAI-1 [57][61]. Des études faites chez des athlètes durant et après un triathlon ont observées pendant l'exercice une hypercoagulation en alternance avec une hyperfibrinolyse avec un retour à la normale 24 heures après l'événement [61][62]. On a aussi constaté une augmentation des D-dimères plasmatiques suite à cette activité [61][62]. Toutes ces études tendent à démontrer que l'exercice augmente considérablement

l'action fibrinolytique du sang et que cette activité revient à son niveau basal entre 45 minutes et 24 heures après l'événement physique.

1.4.7 Fibrinolyse intrarénale

Comme les TDP trouvés chez les athlètes semblent être produit au niveau du rein [25], il faut s'attarder à la fibrinolyse intrarénale. La fibrinolyse en plus d'assurer le maintien de la fluidité vasculaire, assure une bonne fluidité dans toutes les structures du système urinaire principalement au niveau du néphron. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein qui est constitué principalement d'un tubule rénal et de ses éléments vasculaires. Il prend naissance sous la capsule glomérulaire située dans le cortex rénal (Fig.11). Le rôle du néphron est de retirer les déchets du sang et de régler sa teneur en liquide et en électrolytes. La filtration glomérulaire découle de la structure particulière des capillaires glomérulaires, occasionnant une perméabilité importante et, par conséquent, le passage de certains constituants sanguins dans l'urine. La paroi des capillaires glomérulaires est formée d'un endothélium fait d'une couche unique de cellules pourvues de pores mesurant 160 Å de diamètre. Sous cet endothélium se trouve la membrane basale qui est formée de fibrilles à l'intérieur d'une matrice glycoprotéique. Elle ne possède pas de pore et joue le rôle d'une membrane dialysante. Finalement, la dernière couche est l'épithélium du feuillet viscéral de la capsule qui est formée de podocytes et qui possède des pores de 70 Å (Fig.12).

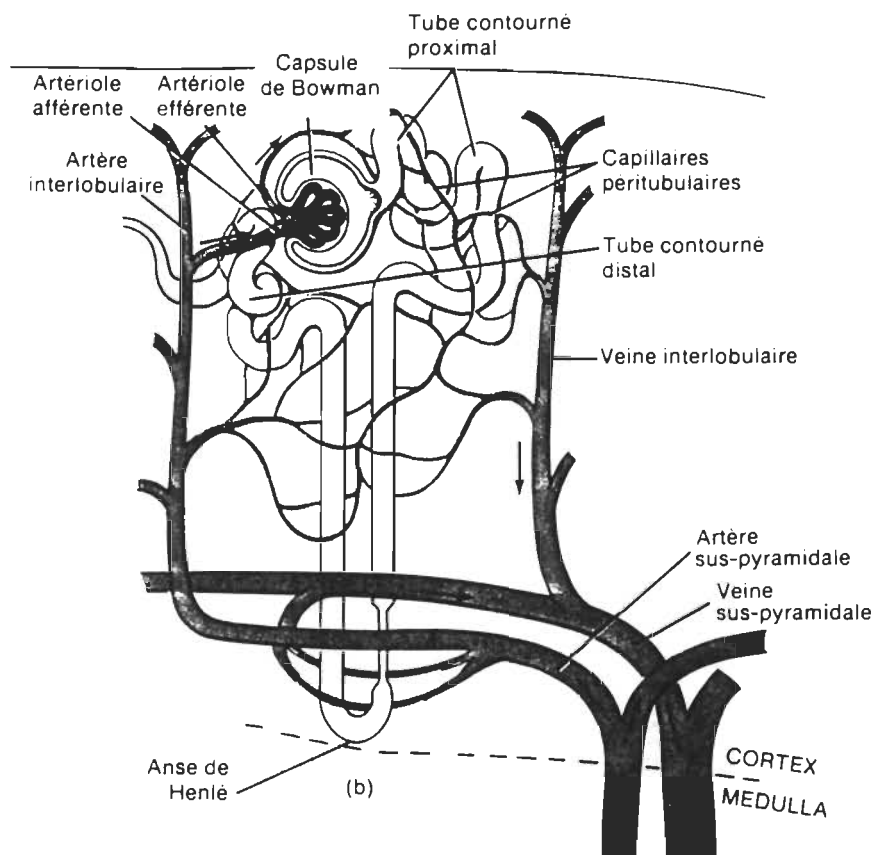


Figure 11. Néphron. (Source : Principes d'anatomie et de physiologie humaine de Gerard J. Tortora et Nicholas P. Anagnostakos, CEC édition, 1988, p. 707)

Ces différentes structures présentent des ouvertures permettant le passage de molécules en fonction de leur taille, ainsi, seules les molécules d'une taille d'environ 70 Å soit environ 70 KDa pourront être filtrées dans l'urine, ce qui exclut les cellules sanguines ainsi que la majorité des protéines plasmatiques. Pour permettre au sang de bien circuler à l'intérieur des vaisseaux fins du système rénal

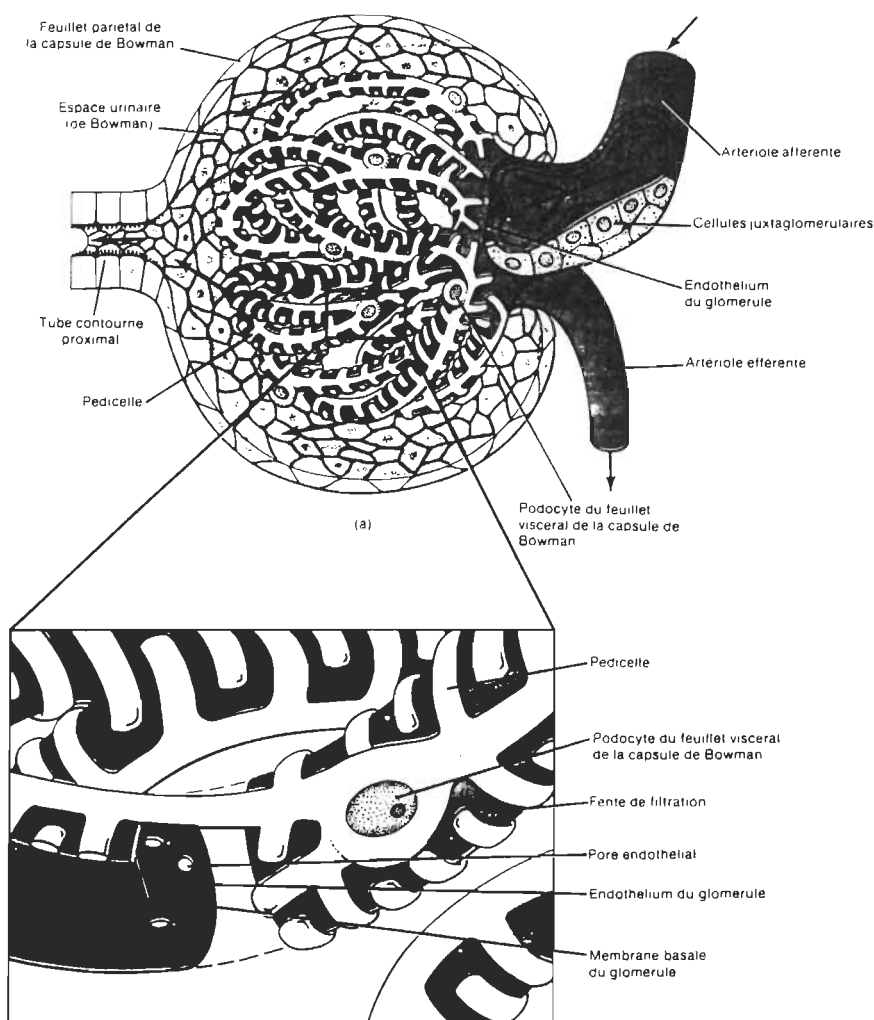


Figure 12. Structure d'un glomérule. (Source : (Source : Principes d'anatomie et de physiologie humaine de Gerard J. Tortora et Nicholas P. Anagnostakos, CEC édition, 1988, p. 708)

et pour éviter l'accumulation de microthrombi dû à l'agrégation de cellules sanguines dans les petits vaisseaux, les activateurs et les inhibiteurs de la

fibrinolyse doivent être en parfait équilibre. C'est à l'intérieur même du rein que ces activateurs et inhibiteurs sont synthétisés pour maintenir la fluidité du sang. Ainsi, le t-PA est synthétisé au niveau des glomérules [40][63][66] et aussi au niveau des tubes collecteurs [65] tandis que l'uPA est synthétisé au niveau des cellules tubulaires [64][65] et des cellules glomérulaires [40][63][66]. Le PAI-1 quant à lui, est synthétisé au niveau des cellules glomérulaires [40][63].

1.4.8 TDP urinaires et érythropoïétine

Tel que mentionné précédemment, une augmentation de TDP dans l'urine d'athlètes suspectés d'avoir pris de la rHuEpo, a été rapportée et une étude réalisée par Gareau et al a démontré que ces TDP ne pouvaient pas provenir d'une filtration rénale [25]. Les TDP proviendraient possiblement d'une production intrarénale de TDP. La production de TDP au niveau de l'urine est généralement associée à des pathologies dégénératives rénales comme dans le cas des glomérulonéphrites prolifératives ou membraneuses et dans le cas de lupus érythémateux systémique. Cet indice sert habituellement pour déterminer l'ampleur d'une maladie au niveau du rein [67][68][69][70] car très peu de TDP sont retrouvés dans l'urine de sujets sains. Le glomérule étant un filtre complexe, il est susceptible aux dommages induit par la déposition locale de fibrine ou d'autres protéines de la matrice [71]. Il est maintenant admis qu'un déséquilibre du système de la coagulation et du système fibrinolytique est impliqué dans

l'apparition de maladies rénales sévères [69]. Un déséquilibre local pourrait contribuer à des dépôts de fibrine glomérulaire [71]. Des dépôts de fibrine glomérulaire ont été observés dans plusieurs cas de glomérulonéphrites et on rapporte une relation très étroite entre le niveau urinaire de TDP et les différents types de glomérulonéphrites [67]. Un groupe de chercheurs a suggéré que dans les glomérulonéphrites où les TDP sont élevés, ce serait des anticorps ou des complexes antigène/anticorps qui activeraient le système du complément qui à son tour endommageraient l'endothélium des vaisseaux glomérulaires. Les plaquettes viendraient adhérer à la membrane basale dénudée où ils initieraient la coagulation résultant en la formation de dépôts de fibrine dans le glomérule [70]. Les TDP retrouvés dans l'urine proviendraient de la lyse de la fibrine des glomérules par les macrophages [70]. Ce scénario pourrait s'appliquer aux athlètes s'injectant de l'Epo exogène car la rHuEpo fait augmenter la viscosité du sang augmentant ainsi les risques de thrombose. Comme les vaisseaux du rein sont très fins, une accumulation de globules rouges pourrait entraîner des agrégats et pourrait endommager l'endothélium de ces vaisseaux pour conduire à la formation de plaque de fibrine selon le principe décrit précédemment.

D'autres études se sont tournées vers le rôle que pourraient jouer les activateurs et les inhibiteurs du plasminogène dans l'accumulation des plaques de fibrine au niveau du rein. Plusieurs études ont démontré que chez des patients atteints de diverses pathologies rénales, l'augmentation du PAI-1 est impliquée dans l'augmentation des dépôts de fibrine glomérulaire [46]. Des dépôts d' α -2-

antiplasmine et de PAI-1 ont été retrouvés dans les glomérules de patients atteints de glomérulonéphrite [40][45][48]. Le PAI-1 semble diminuer l'efficacité du système fibrinolytique dans les glomérules affectés d'une néphropathie [43] et sa concentration semble être en corrélation directe avec le degré de gravité de la maladie [44]. Une augmentation de PAI-1 semble diminuer l'activité fibrinolytique, augmenter les risques de thrombose et induire l'accumulation de matrice extracellulaire [46]. La conclusion tirée est que le PAI-1 joue un rôle majeur dans la persistance des dépôts de fibrine dans le rein durant des conditions pathologiques [47]. Cette conclusion semble confirmée car en condition normale les reins n'expriment pas cet inhibiteur [46][47]. Pour ce qui est des activateurs, le t-PA et l'uPA, deux études ont révélé qu'en condition normale, seul le t-PA est exprimé dans le rein [46][47]. Lors de conditions pathologiques, quelques patients ont exprimé le t-PA mais pas l'uPA [47]. Seule une augmentation marquée du PAI-1 est venue confirmer les études déjà faites à ce sujet [47][48]. Étant donné qu'une augmentation de PAI-1 semble en corrélation directe avec l'augmentation de la fibrine dans le rein et qu'une augmentation de la fibrine dans le rein est accompagnée d'une augmentation de TDP, une augmentation de PAI-1 pourrait donc occasionner une augmentation des TDP chez les athlètes consommant de l'Epo.

Notre hypothèse est donc que les TDP urinaires produits en présence d'Epo exogène pourraient être dus à un déséquilibre des systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse au niveau rénal et c'est ce que ce travail tentera d'éclaircir.

1.5 Objectifs

Les TDP urinaires ont deux origines possibles : intrarénal et/ou intravasculaire. Une étude faite par Gareau et al. a mis de côté l'option d'une production intravasculaire [25]. Dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous tenterons premièrement d'établir si les TDP sont bien produits au niveau du rein et deuxièmement d'établir quel mécanisme est responsable de la production de ces produits de dégradation. La fibrinolyse rénale sera étudiée chez des souris par le biais de diverses méthodes permettant de déterminer si l'administration de rHuEpo entraîne un déséquilibre dans la fibrinolyse.

Cette étude sera réalisée chez des souris atteintes (à long terme) d'une néphropathologie qui rend leurs glomérules plus fragiles et plus sensibles aux changements de condition. Pour ce faire nous quantifierons et qualifierons un activateur et un inhibiteur du plasminogène via trois méthodes biochimiques connues et explorerons la possible corrélation entre l'utilisation de rHuEpo et la production de TDP.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Étude de la fibrinolyse intrarénale

Pour étudier la fibrinolyse intrarénale, nous avons utilisé une espèce de souris de type NZB/NZW (B/W) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA). Les souris NZB/NZW possèdent certaines caractéristiques qui se développent avec l'âge de la souris. Ces souris développent, entre l'âge de six et douze mois, une maladie rénale auto-immune qui ressemble au lupus et qui entraîne la mort de la souris. Comme d'autres formes de glomérulonéphrite, cette maladie rénale est fréquemment accompagnée d'une augmentation de PAI-1 et de dépôts de fibrine au niveau des glomérules et d'une augmentation de l'accumulation de matrice extracellulaire. Le PAI-1 étant indétectable dans les reins de souris saines (non-malades), nous avons décidé d'utiliser les souris B/W puisqu'un changement de la quantité de PAI-1 dans leurs reins pourrait être en concentration détectable. Les reins de ces souris étant plus sensibles aux changements physiologiques que chez les souris saines. Donc, en utilisant ces souris avant l'âge de six mois où elles sont physiologiquement en santé, nous pourrions peut-être caractériser et visualiser des changements au niveau de leurs glomérules et ainsi vérifier notre

| Souris (n =) | Sexe | Âge | Espèce | Traitement | Durée du traitement |
|------------------|------|-------|--------|------------|---------------------|
| 1 | F | 10 s. | B/W | saline | 1 semaine |
| 2 | F | 10 s. | B/W | 1000 U/Kg | 1 semaine |
| 1 | F | 16 s. | B/W | saline | 8 semaines |
| 2 | F | 16 s. | B/W | 20 U/Kg | 8 semaines |
| 1 | F | 18 s. | B/W | 1000 U/Kg | 1 semaine |
| 1 | F | 34 s. | B/W | saline | 4 semaines |
| 2 | F | 34 s. | B/W | 50 U/Kg | 4 semaines |

Tableau 1. Groupes de souris du premier protocole.

| Souris (n =) | Sexe | Âge | Espèce | Traitement | Durée du traitement |
|------------------|------|-------|--------|------------|---------------------|
| 3 | F | 23 s. | B/W | saline | 2 semaines |
| 3 | F | 23 s. | B/W | 50 U/Kg | 2 semaines |
| 3 | F | 23 s. | B/W | 1000 U/Kg | 2 semaines |
| 1 | F | 25 s. | B/W | saline | 4 semaines |
| 3 | F | 25 s. | B/W | 50 U/Kg | 4 semaines |
| 3 | F | 25 s. | B/W | 1000 U/Kg | 4 semaines |
| 1 | F | 27 s. | B/W | saline | 6 semaines |
| 3 | F | 27 s. | B/W | 50 U/Kg | 6 semaines |

Tableau 2. Groupes de souris du deuxième protocole.

hypothèse de départ à savoir que les TDP sont bien produits au niveau du rein.

Nous avons réalisé deux protocoles : un premier pour faire des essais sur les doses et la durée du traitement à la rHuEpo et un deuxième en tenant compte des résultats obtenus lors du premier protocole. Suite aux résultats obtenus lors du premier protocole, la dose minimale requise pour obtenir des changements physiologiques fut déterminée à 50 U/Kg et une dose de 1000 U/Kg fut déterminée comme étant une dose appréciable pour obtenir des changements plus substantiels. La durée de traitement minimale retenue fut de deux semaines tandis que celle de la durée maximale fut de six semaines en raison de la détérioration de l'état de santé des souris. La variation de l'âge des souris dans les deux protocoles est due au fait que les souris, ayant été le sujet d'un problème de commande, n'avaient pas toutes le même âge lors de la réception. Suite au premier protocole, les souris du deuxième protocole furent divisées en plusieurs groupes en fonction des doses de rHuEpo reçues et de la durée du traitement. Les tableaux 1 et 2 décrivent les deux protocoles dans lesquels furent impliquées 30 souris.

2.2 Traitement à l'érythropoïétine

La rHuEpo utilisée lors du premier protocole est de la rHuEpo bêta 3000 IU (Chugai-Upjohn inc, Cambridge, MA, USA) qui fût reconstituée avec trois millilitres de saline stérile 0.9%. Selon le traitement, les souris ont reçu des doses

intrapéritonéales de 20, 50 ou 1000 U/kg, de rHuEpo ou de solution saline physiologique, à raison de trois fois par semaine. Pour le second protocole, la rHuEpo utilisée fût de la rHuEpo alpha 10 000 U/ml (Eprex, Ortho Biologics, Raritan, NJ, USA). Les doses de solutions saline et d'Epo, 20, 50 ou 1000 U/kg, furent injectées à raison de trois fois par semaine. L'utilisation de rHuEpo bêta dans le premier protocole et de rHuEpo alpha dans le deuxième protocole ne vient en aucun cas influencer les résultats puisque ces deux molécules ont le même mode d'action malgré certaines différences au point de vue structural [8].

2.3 Sacrifices et prélèvements

Une fois le traitement terminé, les souris furent anesthésiées par inhalation (Metofane, Janssen pharmaceuticals, Ann Arbor, MI, USA) dans une cloche de verre. Le sang des souris fût prélevé par ponction cardiaque et conservé dans des tubes avec EDTA (# 367653, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Les reins furent ensuite prélevés et conservés à - 80 ° C dans des tubes contenant 10 ml de 2-méthylbutane (Isopentane, Laboratoire MAT, Québec, PQ, Canada) préalablement refroidi à l'azote liquide.

Pour déterminer l'hématocrite de chacune des souris, le sang fût prélevé dans des capillaires non-héparinés (#0266868, FischerBrand, St-Louis, MO, USA), centrifugés cinq minutes à 12000 rpm (Micro-capillary centrifuge, National

Equipment Company, Springhouse, PA, USA) et quantifié à l'aide d'un instrument de lecture pour microcapillaires (Microcapillary reader, International Equipment Company, Springhouse, PA, USA).

2.4 Analyse immunohistochimique

Pour visualiser les changements fibrinolytiques induits par le traitement à la rHuEpo, nous avons utilisé une méthode immunohistochimique par fluorescence.

Coupe des tissus

Les tissus ont été conservés dans l'isopentane à - 80° C jusqu'au moment de la coupe. Les lames de verres (Fisherbrand, no. 12-552, St-Louis, MO, USA) furent préalablement mises dans le cryostat pendant 5 minutes pour qu'elles prennent la température de celui-ci, soit environ -20° C. Le rein fût d'abord collé sur un portoir à l'aide d'une colle pour les tissus (# SH 75125D Histo prep, Fisher Scientifics, St-Louis, MO, USA) et ajusté pour obtenir des coupes horizontales de 5 microns d'épaisseur. Les coupes furent ensuite collées sur la lame à l'aide de la chaleur des doigts et déposées à - 20° C jusqu'à la fixation des tissus.

Fixation des tissus

Les lames furent fixées, au paraformaldéhyde 4 % (Sigma Chemical

Company, St-Louis, MO, USA) fraîchement préparé, pendant dix minutes. Les lames furent ensuite rincées trois fois dans un bain de PBS pH 7.4 et conservées à 4° C pour un maximum de deux jours.

Marquage avec les anticorps

Les lames furent retirées du PBS et essuyées parfaitement sur les rebords et le plus près possible des tissus en évitant que le tissu ne sèche. Ensuite, 50 µl de l'un des trois anticorps fut déposé sur le tissu en évitant que le liquide s'étende à l'extérieur du tissu : 1) pour le PAI-1, un "rabbit anti rat PAI-1 IgG" (American Diagnostica, # 1062, Montréal, PQ, Canada) à une dilution de 1/5 pour une concentration de 250 µg/ml, 2) pour l'uPA, un "rabbit anti mouse urokinase IgG" (American Diagnostica, #1189, Montréal, PQ, Canada) à une dilution de 1/5 pour une concentration de 100 µg/ml et 3) pour le fibrinogène, un "sheep anti-canine fibrinogen IgG" (Cedarlane laboratories, # SACFG-IG, Hornby, ON, Canada) à une dilution 1/5 pour une concentration de 10 mg/ml. Chaque solution d'anticorps fut diluée dans une solution bloquante de PBS+1% de sérum de chèvre (École vétérinaire, St-Hyacinthe, PQ, Canada). Les lames furent incubées pendant deux heures à la température de la pièce dans un contenant translucide fermé.

Suite à l'incubation, les lames furent lavées une à une par six plongeurs consécutifs dans trois bains de PBS pH 7.4. Elles furent de nouveau essuyées pour ensuite y ajouter le second anticorps, soit un "fluorescein-conjugated goat

anti-rabbit IgG" (Jackson immunoresearch laboratories, # 111-095-144, West Grove, PA, USA) ou soit un âne anti-mouton IgG FITC (Serotec, # 2ABO3F, Oxford, Angleterre) dilué 1/50 dans du PBS. L'incubation fut de 30 minutes à la température de la pièce. Avant le montage, les lames furent à nouveau lavées comme décrit précédemment.

Montage des lames

Pour le montage des lames, nous avons utilisé un milieu de montage pour fluorescence : 1 ml de p-phénylènediamine 1% p/v (Fisher Scientifics, St-Louis, MO, USA), 3 ml d'H₂O et 1 ml de PBS 10X. Juste avant l'utilisation de cette solution, du glycérol a été ajouté dans des proportions de 1 : 1. Les lames furent donc essuyées pour enlever l'excédent de PBS et une goutte du milieu de montage a été ajoutée à chacune des lames avant d'y déposer une lamelle. L'excédent de milieu de montage fut absorbé par un papier Whatman (Biorad, #165-0921, Mississauga, ON, Canada) et les lames furent entreposées à -20°C dans un dortoir en carton pour les protéger de la lumière. Les lames étaient prêtes pour l'observation et les photos.

Photographies et développement

Les photos de glomérules furent prises à l'aide d'un microscope à

fluorescence munie d'une caméra 35 mm (Olympus BX60, Melvill, NY, USA). Pour les photos, un film en noir et blanc fut utilisé (Tmax p 3200, Kodak, Toronto, ON, Canada) et développé en chambre noire (développeur Tmax, Kodak, fixateur kodafix, Kodak, Toronto, ON, Canada). Des photos furent tirées à partir du film pour permettre l'analyse des résultats. (révélateur papier, Ilford, Markham, ON, Canada et fixateur Kodafix, Kodak, Toronto, ON, Canada)

2.5 Dosage du PAI-1 par ELISA

Comme aucun essai déjà préparé n'était disponible sur le marché pour doser le PAI-1 de souris ou de rat, nous avons utilisé un ELISA expérimental provenant du laboratoire du centre de biologie moléculaire et vasculaire de l'Université de Leuven en Belgique [72]. Le Dr Paul J. Declerk nous a gracieusement fourni le matériel nécessaire à la réalisation du protocole [72]. Le matériel fourni était constitué de : l'anticorps MA-H34G6 (anti-PAI-1 pour tapisser le fond des puits, 3mg/ml), de l'anticorps MA-H14H7-HRP (un anti-PAI-1 marqué à la peroxidase), du PAI-1 de souris (0.54 mg/ml) et du polyéthylène glycol(PEG) 20 000.

Préparation des tissus

Les reins entiers ont été broyés à froid avec de l'azote liquide pour l'obtention d'une poudre fine. Ensuite, 0.05 g de cette poudre fut solubilisée dans

500 µl d'un tampon d'homogénéisation (0.0625 M de Tris-HCl, 2.3 % de SDS) et incubé 30 minutes à la température de la pièce avec agitation. Cette solution fut ensuite diluée dans le tampon de dilution (PBS pH 7.4, Tween 80 0.002%, EDTA 5 mM et BSA 1 g/L) dans des proportions de 1:3.

Préparation des plaques

Le premier anticorps, le MAH34G6, fut dilué dans du tampon PBS-PEG 20000 1 % à pH 7.4 pour l'obtention d'une concentration finale de 4 µg/ml. 200 µl de cette solution d'anticorps fut déposée dans chacun des puits et incubée à 4°C pendant 48 heures. Les puits furent vidés par aspiration et lavés trois fois avec un tampon de lavage (PBS-Tween 80 0.002%). Le blocage des puits fut réalisé pendant 2 heures à la température de la pièce par du PBS-BSA 1% pour être ensuite lavés trois fois par le tampon de lavage. Les plaques furent vidées par aspiration, recouvertes et entreposées à la noirceur à -20°C jusqu'à l'utilisation.

Préparation de la courbe étalon

Le PAI-1 de souris fut dilué dans le tampon de dilution (PBS pH 7.4, Tween 80 0.002%, EDTA 5mM, BSA 1 g/L) pour obtenir des concentrations de 100, 50, 25, 12.5 et 0 ng/ml.

ELISA

Avant l'utilisation, les puits furent lavés une fois avec 200 µl de PBS pH 7.4. Ensuite, 180 µl de standard, d'échantillon ou de tampon de dilution fut déposé dans les puits. La plaque fut recouverte et incubée 18 heures à 4°C dans une chambre humide pour ensuite être lavée quatre fois avec le tampon de lavage. Un volume 170 µl de l'anticorps MAH14H7-HRP fut ajouté (dilution 1 : 4000 dans du tampon PBS pH 7.4, Tween 80 0.002%, BSA 0.1%) dans chacun des puits puis incubé deux heures à la température de la pièce. Cette incubation fut suivie de quatre lavages et de l'ajout de 160 µl de substrat (25 ml de tampon citrate-phosphate 0.1 M, pH 5.0, 6 mg de o-phénylènediamine (OPD, Fisher Scientifics, St-Louis, MO, USA) et 1 µl de peroxyde d'hydrogène 30 % (Fischer Scientifics, St-Louis, MO, USA)). Après une incubation de 30 minutes avec le substrat, la réaction fut arrêtée par 50 µl de H₂SO₄ 4 M et la lecture de la plaque effectuée grâce à un lecteur de plaque à 492 nm (Microplate reader, Biorad, modèle 450, Mississauga, ON, Canada).

2.6 Identification du PAI-1 et de l'uPA par immunoempreinte

Nous avons utilisé la méthode de l'immunoempreinte pour identifier le PAI-1 et l'uPA et pour confirmer les résultats obtenus par l'immunofluorescence.

Préparation du tissu rénal

Les reins furent pesés et broyés à froid dans du tampon d'échantillon (Tris-HCl 0.0625 M, SDS 2.3 %) à l'aide d'un homogénéisateur pour l'obtention d'environ 0.1 g/ml de tissu. Comme la quantité de protéine de chacun des échantillons n'était qu'approximative, nous avons fait un dosage de protéine par la méthode de Folin-Lowry modifiée pour la présence de SDS dans l'échantillon [73]. Suite à ce dosage, chaque échantillon fut dilué pour l'obtention d'une concentration finale de 2 ug/ul de protéines totales. Une fois les échantillons prêts, nous avons utilisé 50 ug de chacun auquel nous avons ajouté du tampon 4X (Trizma-base 0.313 M, pH 6.8, SDS 5% p/v, glycérol 50 % v/v, bleu de bromophénol 0.05% p/v, mercaptoéthanol 10% v/v) soit trois volumes d'échantillon pour un volume de tampon 4X. Le tout fut bouilli cinq minutes et centrifugé cinq minutes à 13 000g pour éliminer les débris cellulaires. Les échantillons étaient prêts pour l'expérimentation.

Électrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse fut réalisée selon la méthode de Laemli [74] dans un appareil à mini-gel (Miniprotean II, Biorad, Mississauga, ON, Canada) à l'aide d'un gel de compression de 4% et d'un gel de séparation de 12%.

Le gel de séparation fut réalisé à partir des produits et volumes suivants (tous provenant de chez Biorad, Mississauga, ON, Canada) ;

- 6.11 ml d'acrylamide-bisacrylamide (30 : 0.8)
- 5.6 ml de Tris-HCl 1M, pH 8.8
- 0.15 ml de SDS 10 %
- 1.125 ml d'ammonium persulfate 10% p/v
- 1.8 ml d'eau distillée
- 0.45 ml de TEMED (50 μ l de TEMED + 950 μ l d'eau)

Le gel de compression fut réalisé à l'aide des produits et volumes suivants ;

- 0.49 ml d'acrylamide-bisacrylamide (30 : 0.8)
- 0.625 ml de Tris-HCl 1M, pH 6.8
- 0.05 ml de SDS 10 %
- 3.31 ml d'eau distillée
- 0.375 ml d'ammonium persulfate 10 % p/v
- 0.150 ml de TEMED (voir ci-haut)

L'appareil fut monté en laissant 1.5 mm entre les deux vitres. Les gels furent coulés un à la suite de l'autre en laissant dix puits à la surface du gel de compression. Le gel fut ensuite placé dans le réservoir où se trouvait le tampon de cuve (Tris 0.025 M, glycine 0.192 M, SDS 0.1 % p/v, pH 8.3). Chacun des

échantillons fut déposé dans les puits ainsi que 10 µl d'un standard kaléidoscope (# 1610324, Biorad, Mississauga, ON, Canada) pour permettre la visualisation de l'électrophorèse. Nous avons appliqué 75 Volts pour faire migrer les protéines à travers le gel de compression et 150 Volts pour le gel de séparation. Nous avons fait migrer les protéines jusqu'à ce que le front de colorant se retrouve à 0.5 cm de la fin du gel.

Transfert sur nitrocellulose

Après l'arrêt de l'électrophorèse, le gel de compression fut enlevé pour ne récupérer que le gel séparateur. Le gel séparateur fut placé dans un système sandwich composé, dans l'ordre, des éléments suivants (provenant tous de chez Biorad, Mississauga, ON, Canada) ;

- un support plastique
- un tampon Scotch brite
- deux feuilles de papier Whatman
- une feuille de nitrocellulose avec support
- le gel séparateur
- deux feuilles de papier Whatman
- un tampon Scotch brite
- un support plastique

Le système sandwich fut déposé dans l'appareil de transfert (Biorad, Mississauga, ON, Canada) rempli de tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20 % v/v, pH 8.3). Nous avons fait transférer les protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose pendant trois heures à 500 mA.

Après le transfert, la membrane de nitrocellulose fut sortie du système sandwich et rincée à l'eau distillée. La membrane fut colorée au Rouge Ponceau pendant cinq minutes afin de vérifier si le transfert s'était bien effectué. La membrane fut ensuite décolorée au PBS pH 7.4 pendant dix minutes pour être bloquée toute la nuit à 4° C dans du tampon bloquant (PBS-lait 0.5 %).

Addition des anticorps

Après le blocage, la membrane fut lavée deux fois cinq minutes dans du PBS. Les anticorps primaires (soit un "rabbit anti-rat PAI-1 IgG" (American Diagnostica, # 1062, Montréal, PQ, Canada) ou un "rabbit anti-mouse urokinase IgG" (American Diagnostica, # 1189, Montréal, PQ, Canada)) à des concentrations de 5 ug/ml pour le PAI-1 et 10 mg/ml pour l'uPA furent ajoutés et incubés deux heures à 37° C dans des sacs de plastiques. L'incubation fut suivie de deux lavages de 20 minutes chacun dans du PBS-Tween 20, 0.1 %.

Le deuxième anticorps fut ensuite ajouté (un "peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG" (Jackson immunoresearch laboratories, #711-035-132, West Grove, PA, USA)) à une dilution de 1/2000 pendant une heure à la température de la pièce, dans un sac de plastique avec agitation. Cette incubation fut suivie de trois lavages de 20 minutes dans du PBS-Tween 20, 0.1 % et de deux lavages de 20 minutes dans du PBS seul.

Détection

Pour la détection, nous avons utilisé une trousse de chemiluminescence (Boehringer Mannheim, #1520 709, Laval, PQ, Canada). Une fois la membrane lavée, nous l'avons déposée sur une pellicule de plastique avec 500 ul de la solution de détection (solution A et solution B de la trousse dans un ratio de 100 : 1 et préalablement incubé 30 minutes à la température de la pièce) pendant une minute. Après avoir enlevé l'excédent de la solution de détection, la membrane fut recouverte d'une autre pellicule de plastique. La membrane entre pellicule fut déposée dans une cassette pour films à rayons X (Kodak X-omatic cassette, Kodak, Toronto, ON, Canada) et recouverte d'un film à rayons X (medical film, Konica, Englewood, NJ, USA). Le film fut exposé une minute à la noirceur, développé une minute dans la solution développante (développeur D-19, Kodak, Toronto, Canada) et fixé dix minutes dans le fixateur (Kodafix solution, Kodak, Toronto, Canada). Selon l'intensité du signal, de nouveaux films furent exposés

pour des temps variant entre cinq minutes et une heure. Suite à cela, les films furent séchés et prêts pour l'analyse du PAI-1 et de l'uPA.

2.7 Statistiques

Les résultats obtenus lors de la lecture de l'hématocrite et de l'ELISA sont exprimés en moyennes avec l'écart type pour chacun des groupes. Les résultats obtenus lors des lectures d'immunohistochimie sont exprimés, selon la présence ou l'absence, en terme de +++, ++, + ou 0 en fonction de la fluorescence exprimée par les glomérules. Dû au faible nombre de souris par groupe, nous n'avons pu effectué de test statistique sur les données. Les résultats obtenus tenteront donc d'éclaircir certains mécanismes sans pouvoir toutefois apporter des confirmations.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Les résultats de nos analyses sur la fibrinolyse intrarénale se divisent en quatre volets selon la méthode d'analyse utilisée. Le premier volet indique les valeurs de poids et d'hématocrite obtenues chez les souris traitées ou non à la rHuEpo pour ainsi s'assurer de l'efficacité du traitement. Le deuxième volet est une analyse immunohistochimique permettant de visualiser le PAI-1, l'uPA et/ou le fibrinogène. Le troisième volet est une analyse par ELISA permettant de quantifier le PAI-1 et l'uPA retrouvés dans les reins de souris traitées ou non. Le quatrième volet est l'analyse du PAI-1 et de l'uPA par l'immunoempreinte (Western blot) dans un but de confirmation des résultats obtenus par les méthodes précédentes.

3.1 Étude des changements physiologiques suite à un traitement à l'Epo

Suite à un traitement à la rHuEpo à court ou long terme, à faible ou forte dose, les souris subissent des changements physiologiques importants. Celui qui nous intéresse le plus est la valeur de l'hématocrite car il reflète, dans des conditions normales, une hausse de la quantité de globules rouges et indique

l'efficacité du traitement. Le tableau 3 présente les résultats d'hématocrite obtenus pour les groupes de souris faisant partis de nos deux protocoles. Les résultats présentés aux tableaux 3 et 4 indiquent que les souris, n'ayant reçu que de la solution saline, ont en moyenne un hématocrite qui se situe autour de 0.35 ± 0.02 . Si on les compare avec les souris ayant reçu des injections d'Epo de 50 U/Kg, on remarque chez celles-ci une légère augmentation avec une moyenne d'environ 0.39 ± 0.03 d'hématocrite. Les souris ayant reçu des injections d'Epo de 1000 U/Kg démontrent toutes une élévation plus prononcée avec des valeurs variant entre 0.41 et 0.60 ± 0.05 d'hématocrite. L'ensemble de ces résultats suggère l'efficacité du traitement à la rHuEpo.

3.2 Étude des changements fibrinolytiques intrarénaux par immunofluorescence

Nous avons étudié les changements fibrinolytiques intrarénaux des souris par le biais de l'immunofluorescence ou de l'immunohistochimie par fluorescence. Le but de cette analyse est de visualiser les changements de concentration des différentes molécules au niveau des glomérules. Nous avons décidé de faire l'analyse du PAI-1, de l'uPA et du fibrinogène au niveau des glomérules (nous voulions analyser la fibrine mais aucun anticorps anti-fibrine de souris n'était disponible). Les résultats de cette analyse se retrouvent aux tableaux 5 et 6. Comme cette analyse est plus qualitative que quantitative, les résultats sont

| Souris (n =) | Sexe | Âge | Différence de poids | Traitement | Durée du traitement | Hématocrite |
|-------------------|------|-------|------------------------|------------|------------------------|-----------------|
| 1 | F | 10 s. | +0.1 g | saline | 1 semaine | 0.35 \pm 0.00 |
| 2 | F | 10 s. | +0.6 g | 1000 U/Kg | 1 semaine | 0.60 \pm 0.05 |
| 1 | F | 16 s. | +13.2 g | saline | 8 semaines | 0.35 \pm 0.00 |
| 2 | F | 16 s. | -2.0 g | 20 U/Kg | 8 semaines | 0.31 \pm 0.05 |
| 1 | F | 18 s. | +0.1 g | 1000 U/Kg | 1 semaine | 0.41 \pm 0.00 |
| 1 | F | 34 s. | +3.0 g | saline | 4 semaines | 0.35 \pm 0.00 |
| 2 | F | 34 s. | +1.0 g | 50 U/Kg | 4 semaines | 0.37 \pm 0.02 |

Tableau 3. Différences de poids et hématocrite des souris du premier protocole.

| Souris (n=) | Sexe | Âge | Différence de poids | Traitement | Durée du traitement | Hématocrite |
|------------------|------|-------|------------------------|------------|------------------------|-----------------|
| 3 | F | 23 s. | -0.3 g | saline | 2 semaines | 0.39 \pm 0.02 |
| 3 | F | 23 s. | -1.5 g | 50 U/Kg | 2 semaines | 0.42 \pm 0.03 |
| 3 | F | 23 s. | -1.0 g | 1000 U/Kg | 2 semaines | 0.54 \pm 0.02 |
| 1 | F | 25 s. | -1.6 g | saline | 4 semaines | 0.35 \pm 0.00 |
| 3 | F | 25 s. | +2.4 g | 50 U/Kg | 4 semaines | 0.39 \pm 0.03 |
| 3 | F | 25 s. | +0.6 g | 1000 U/Kg | 4 semaines | 0.56 \pm 0.01 |
| 1 | F | 27 s. | +0.7 g | saline | 6 semaines | 0.35 \pm 0.00 |
| 3 | F | 27 s. | +1.0 g | 50 U/Kg | 6 semaines | 0.39 \pm 0.02 |

Tableau 4. Différences de poids et hématocrite des souris du deuxième protocole.

donnés sous forme de présence ou d'absence de fluorescence correspondant à +, ++, +++ ou 0 selon la fluorescence observée au niveau des glomérules. Les figures 13 et 14 montrent les photos de glomérules qui ont été tirées à partir de ces lames.

Les résultats présentés aux tableaux 5 indiquent qu'un traitement d'une semaine à 1000 U/Kg ne présente aucun changement au niveau de la fluorescence des paramètres mesurés malgré un hémocrite de 0.41 ou 0.60. Dans le cas d'un traitement de huit semaines à 20 U/Kg nous remarquons une faible augmentation de la fluorescence du PAI-1 dans les glomérules par rapport au contrôle. Pour les souris ayant reçues un traitement de 50 U/Kg durant 4 semaines, les résultats sont les mêmes. Les résultats furent sensiblement les mêmes pour l'uPA. Le fibrinogène n'a pu être mesuré dans ce protocole puisque nous n'avions pas encore trouvé d'anticorps anti-fibrinogène à ce moment. Suite à ces constatations, nous avons réalisé le deuxième protocole en employant des temps de traitement variant de deux à six semaines et des doses de 50 ou 1000 U/Kg.

Les résultats du tableau 6 démontrent que, par rapport aux contrôles qui ne démontrent aucune fluorescence, les souris ayant subi un traitement de 2 semaines à 50 U/Kg ont une augmentation du PAI-1 et que cette augmentation se reproduit pour un traitement de 1000 U/Kg.

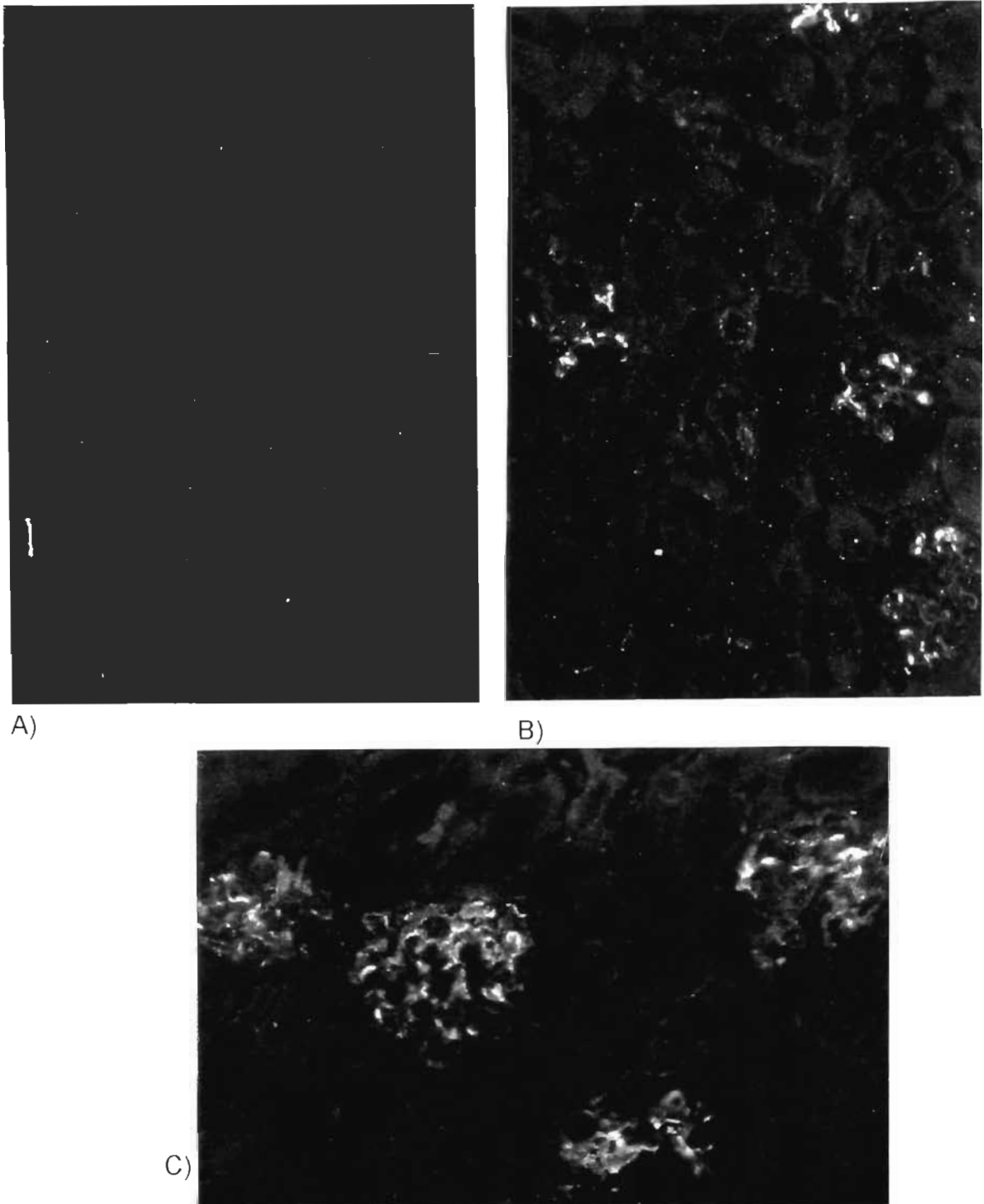


Figure 13. Photos de glomérules de souris B/W soumis à de l'anti-PAI-1 après un traitement de 4 semaines avec A) une solution saline, B) de la rHuEpo à 50 U/Kg et C) de la rHuEpo à 1000 U/Kg.

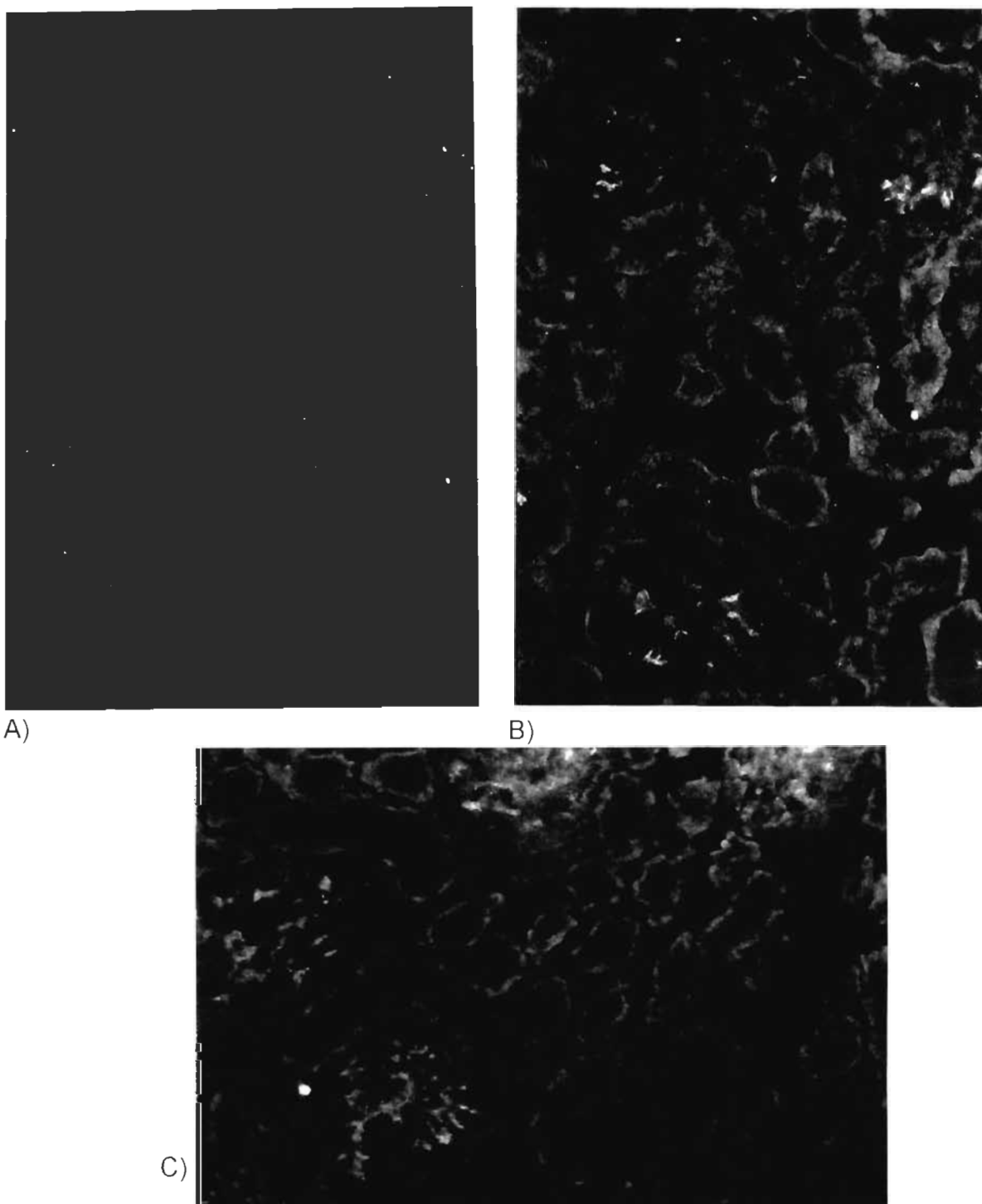


Figure 14. Photos de glomérules de souris B/W soumis à de l'anti-uPA après un traitement de 4 semaines avec A) une solution saline, B) de la rHuEpo à 50 U/Kg et C) de la rHuEpo à 1000 U/Kg.

| Souris (n =) | Sexe | Âge | Traitement | Durée du traitement | PAI-1 | uPA | Fibrinogène |
|-------------------|------|-------|------------|------------------------|-------|-----|-------------|
| 1 | F | 10 s. | saline | 1 semaine | 0 | + | n/d |
| 2 | F | 10 s. | 1000 U/Kg | 1 semaine | 0 | + | n/d |
| 1 | F | 16 s. | saline | 8 semaines | 0 | + | n/d |
| 2 | F | 16 s. | 20 U/Kg | 8 semaines | + | + | n/d |
| 1 | F | 18 s. | 1000 U/Kg | 1 semaine | + | + | n/d |
| 1 | F | 34 s. | saline | 4 semaines | + | ++ | n/d |
| 2 | F | 34 s. | 50 U/Kg | 4 semaines | ++ | ++ | n/d |

Tableau 5. Analyse immunohistochimique de l'uPA, du PAI-1 et du fibrinogène des souris du premier protocole.

| Souris (n =) | Sexe | Âge | Traitement | Durée du traitement | PAI-1 | uPA | Fibrinogène |
|-------------------|------|-------|------------|------------------------|-------|-----|-------------|
| 3 | F | 23 s. | saline | 2 semaines | 0 | + | + |
| 3 | F | 23 s. | 50 U/Kg | 2 semaines | ++ | + | + |
| 3 | F | 23 s. | 1000 U/Kg | 2 semaines | +++ | ++ | + |
| 1 | F | 25 s. | saline | 4 semaines | 0 | + | + |
| 3 | F | 25 s. | 50 U/Kg | 4 semaines | ++ | ++ | 0 |
| 3 | F | 25 s. | 1000 U/Kg | 4 semaines | +++ | ++ | + |
| 1 | F | 27 s. | saline | 6 semaines | ++ | ++ | + |
| 3 | F | 27 s. | 50 U/Kg | 6 semaines | +++ | +++ | 0 |

Tableau 6. Analyse immunohistochimique de l'uPA, du PAI-1 et du fibrinogène des souris du deuxième protocole.

Pour ce qui est de l'uPA, nous remarquons une légère augmentation de la fluorescence des glomérules pour le traitement de 1000 U/Kg, tandis que la fluorescence du traitement de 50 U/Kg est demeurée la même que les témoins. Pour le traitement de quatre semaines, nous remarquons que le PAI-1 a le même type d'augmentation que pour le traitement de deux semaines et ce, pour les traitements de 50 et 1000 U/Kg. Pour l'uPA, nous remarquons une légère augmentation pour le traitement à 50 U/Kg et les résultats sont les mêmes pour le traitement à 1000 U/Kg. Pour le traitement de six semaines, nous notons que le témoin a déjà une fluorescence marquée au niveau de ses glomérules. Ceci est sûrement dû au fait que ces souris développent, entre 24 et 48 semaines, une maladie qui fait augmenter le taux de PAI-1 au niveau des reins [46]. Cette souris commençait sûrement à exprimer les symptômes de la maladie. Malgré ce fait, nous notons que les souris ayant subi le traitement de 50 U/Kg, démontrent quand même une plus grande fluorescence que celle du témoin. Même chose pour l'uPA. Finalement, pour le traitement de huit semaines, à 20 U/Kg, nous remarquons une faible augmentation du PAI-1 et aucune augmentation de l'uPA. Pour ce qui est du fibrinogène, le deuxième protocole ne démontre aucune augmentation de la fluorescence chez les souris traitées à la rHuEpo par rapport aux souris contrôles.

3.3 Étude des variations du PAI-1 et de l'uPA intrarénales par ELISA

Suite aux résultats obtenus en immunohistochimie, nous avons voulu

quantifier par dosage l'uPA et le PAI-1 des glomérules pour ainsi confirmer ces résultats. Comme le fibrinogène n'offrait pas de différences significatives, nous ne l'avons pas dosé. Malheureusement, aucun test ELISA commercial n'existait pour doser le PAI-1 et l'uPA. Nous avons donc décidé de faire un ELISA maison pour

| Souris (n =) | Sexe | Âge | Traitement | Durée du traitement | PAI -1 (ng/ml) |
|-------------------|------|-------|------------|------------------------|-------------------|
| 3 | F | 23 s. | saline | 2 semaines | 0.05 \pm 0.06 |
| 3 | F | 23 s. | 50 U/Kg | 2 semaines | 3.36 \pm 05.61 |
| 3 | F | 23 s. | 1000 U/Kg | 2 semaines | 68.75 \pm 93.75 |
| 1 | F | 25 s. | saline | 4 semaines | 0.27 \pm 0.00 |
| 3 | F | 25 s. | 50 U/Kg | 4 semaines | 1,97 \pm 4.30 |
| 3 | F | 25 s. | 1000 U/Kg | 4 semaines | 7.58 \pm 6.28 |
| 1 | F | 27 s. | saline | 6 semaines | 0.01 \pm 0.00 |
| 3 | F | 27 s. | 50 U/Kg | 6 semaines | 4.44 \pm 7.65 |

Tableau 7. Concentration de PAI-1 intrarénale chez les souris du deuxième protocole.

chacun d'eux mais comme il existait seulement un anticorps pour l'uPA de souris, nous avons été dans l'impossibilité de faire ce test pour l'uPA. Pour le PAI-1, nous avons deux anticorps pour faire le test, mais il fut impossible d'en tirer des résultats valables. Suite à cela, nous avons trouvé un ELISA expérimental pour le

PAI-1 de souris et nous avons réussi à obtenir le matériel nécessaire pour le faire. Ayant obtenu des résultats concluants lors d'essais préliminaires nous avons pu utiliser ce test pour le PAI-1. Ce test fut appliqué seulement pour les souris du protocole 2. Le tableau 7 donne les résultats pour le test ELISA effectué sur ces souris. Les résultats du tableau 7 démontrent clairement une augmentation du PAI-1 à mesure que nous augmentons la dose de rHuEpo durant une période de temps définie. Cependant, nous remarquons que la durée du traitement ne vient pas influencer la concentration du PAI-1 retrouvée dans les tissus puisque dans le traitement de 4 semaines, la concentration de PAI-1 pour 1000 U/Kg est de 7.577 ng/ml alors que pour le traitement de 2 semaines, pour la même dose, la concentration est de 68.753 ng/ml. Nous remarquons cependant que les écarts type sont très grands et ceci est dû au fait que dans lors des ELISA, une plaque d'essai pouvait donner des résultats très élevés tandis qu'une autre pouvait donner des résultats très bas. Malgré la grande divergence des résultats, qui peut être dû à l'utilisation d'un ELISA expérimental, nous avons toujours noté une augmentation du PAI-1 en fonction de la dose de rHuEpo. Les résultats de l'ELISA semblent donc appuyer les résultats obtenus en immunofluorescence malgré que la concentration du PAI-1 ne soit pas directement proportionnelle au taux de fluorescence des glomérules. Cela peut s'expliquer par le fait que l'analyse immunohistochimique est strictement visuelle, donc qualitative, comparativement à une technique d'analyse quantitative comme l'ELISA.

3.4 Étude des variations de l'uPA et du PAI-1 intrarénales par immunoempreinte

En raison de divers problèmes techniques, l'analyse par immunoempreinte n'a pu être menée à terme. Le principal problème rencontré fut l'incapacité d'obtenir une bande pour l'uPA et le PAI-1 en raison de la faible quantité de tissu disponible. L'analyse fut répétée maintes et maintes fois sans résultats.

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Discussion

La mise en marché de la rHuEpo en 1988 a apporté beaucoup d'espoir pour les malades atteints d'anémie alors que d'autres y ont vu un moyen plus qu'intéressant d'augmenter leur hématoците et en même temps leurs performances sportives. La rHuEpo devient donc une drogue de choix pour les tricheurs puisqu'elle procure encore l'avantage d'être indétectable dans l'urine, le seul liquide biologique autorisé par le CIO. Certaines fédérations, comme la Fédération internationale de ski et l'Union cycliste internationale, peuvent utiliser le sang comme matrice biologique mais seul le taux d'hémoglobine ou d'hématocrite peut être mesuré et ceci donne bien peu d'indices sur la prise illicite de rHuEpo [15][16][17][18]. Comme la rHuEpo est indétectable dans l'urine, les travaux se sont dirigés vers la recherche de marqueurs secondaires du dopage hormonal dans ce liquide. Les travaux réalisés précédemment par l'équipe du Dr Gareau ont permis de mettre en évidence une augmentation d'un marqueur secondaire, les TDP urinaires, en présence de rHuEpo [22][23][24]. Le but de ces travaux

[22][23][24] fut de déterminer d'où provenait cette augmentation des TDP urinaires : augmentation de la filtration rénale des TDP plasmatiques ou formation intrarénale des TDP suite à une modification de la fibrinolyse rénale. Les deux hypothèses furent expérimentées et suite aux résultats non équivoques, la deuxième hypothèse fut retenue [25].

Mes travaux sont le prolongement de cette recherche [25] et sont orientés vers la recherche des changements fibrinolytiques au niveau intrarénale et plus précisément au niveau glomérulaire. La fibrinolyse, en plus d'assurer le maintien de la fluidité vasculaire, assure une bonne fluidité dans toutes les structures du système urinaire principalement au niveau du néphron. Pour permettre au sang de bien circuler à l'intérieur des vaisseaux fins du système rénal et pour éviter l'accumulation de microthrombi dû à l'agrégation de cellules sanguines dans les petits vaisseaux, les activateurs et les inhibiteurs de la fibrinolyse doivent être en parfait équilibre. Il est maintenant admis qu'un déséquilibre du système de la coagulation et/ou du système fibrinolytique est impliqué dans l'apparition de maladies rénales graves [37][38][40][41][42][43][44][46][47][48]. Un déséquilibre local lié à la prise de rHuEpo pourrait contribuer à des dépôts de fibrine glomérulaires et ces dépôts pourraient être à l'origine du taux élevé de TDP urinaires rencontré chez les athlètes suspectés de se doper avec cette hormone. Un second mécanisme, pouvant expliquer la présence de TDP urinaires chez les cas des athlètes s'injectant de la rHuEpo, est que lorsqu'il y a augmentation de la

viscosité du sang [50][75][76], il y aurait accumulation de globules rouges dans les vaisseaux des reins et cette accumulation pourrait entraîner des agrégats, endommageant l'endothélium de ces vaisseaux pour finalement conduire à la formation de plaques de fibrine dans les glomérules. Des études, faites sur des patients atteints de polycythémie, ont révélé une augmentation importante du taux de thrombose [50][75][76] avec apparition dans certains cas de glomérulonéphrites avec dépôts de fibrine [75][77]. Les TDP retrouvés dans l'urine proviendraient de la lyse de ces dépôts de fibrine par le système fibrinolytique. Peu importe le mécanisme envisagé, il était nécessaire de mesurer la quantité d'enzymes fibrinolytiques présente dans les glomérules puisque celle-ci est proportionnelle à l'activité fibrinolytique donc à la quantité de fibrine glomérulaire.

Pour analyser l'intégrité du système fibrinolytique chez les sujets s'injectant de la rHuEpo, nous avons injecté à des souris des doses variables de cette hormone pour vérifier l'effet de ce dopage sur leurs système rénal. Les résultats présentés aux tableaux 3 et 4 démontrent que les souris ayant reçu une solution saline présentent un taux moyen d'hématocrite de 0.35 alors que celles ayant reçu des doses variants entre 50 et 1000 U/Kg, présentent une augmentation de l'hématocrite dépendant de la dose. Nous notons cependant que la durée du traitement ne semble pas influencer la valeur de l'hématocrite. Ces résultats nous prouvent l'efficacité du traitement et confirment ainsi la littérature publiée depuis plus d'une décennie.

Suite au traitement, nous avons comme but d'analyser les changements de concentrations des enzymes importantes impliquées dans la fibrinolyse intrarénale pour vérifier si les activateurs et les inhibiteurs étaient en équilibre. Avant de faire cette analyse, nous avons décidé de marquer nos coupes de reins par immunofluorescence avec de l'anti-fibrinogène, pour vérifier s'il y avait effectivement des dépôts dans les glomérules. Nous voulions marquer nos coupes avec un anticorps anti-fibrine mais aucun anticorps de ce type n'était disponible sur le marché. Les résultats présentés au tableau 6 ne donnent aucun indice sur les dépôts de fibrinogène puisque tous les résultats sont similaires d'un groupe de souris à l'autre. Comme il y avait peu de fluorescence dans les glomérules, nous avons émis comme hypothèse que l'anticorps dirigé contre le fibrinogène pouvait ne pas être suffisamment spécifique ou présenter une faible affinité contre cette molécule puisque celui-ci n'était pas un anti-souris mais plutôt un anti-chien soi-disant capable de se lier avec le fibrinogène de souris. Il aurait fallu un anti-fibrine ou un anti-fibrinogène de souris mais aucun anticorps de ce genre n'était disponible sur le marché. Comme les activateurs et les inhibiteurs avaient augmenté en présence de fibrine, nous avons décidé de nous y fier pour savoir s'il y avait bien des dépôts de fibrine dans nos reins.

Pour cette partie nous avons décidé d'étudier l'uPA et le PAI-1. Nous avons choisi l'uPA comme activateur car lors de travaux fait précédemment par l'équipe du Dr Gareau [25], une augmentation de l'uPA urinaire avait été obtenue en même temps qu'une augmentation des TDP [25]. Une augmentation de l'uPA traduit une

augmentation de la fibrinolyse, c'est à dire une augmentation de l'activation du plasminogène en plasmine qui à son tour dégrade la fibrine et la fragmente en produits de dégradation de plus en plus petits, les TDP. Une augmentation de l'uPA traduirait indirectement une augmentation des dépôts de fibrine dans les glomérules. Nous avons ensuite évalué, par immunohistochimie, le taux d'uPA présent dans les reins de nos souris traitées. Les résultats présentés aux tableaux 5 et 6 montrent une légère augmentation de l'uPA, en fonction de la dose de rHuEpo, pour les traitements de deux, quatre et six semaines du deuxième protocole. Nous notons aussi que le taux d'uPA augmente en fonction du temps de traitement ; pour une dose de 50 U/Kg, l'uPA passe de + à ++ entre deux et quatre semaines et passe de ++ à +++ entre quatre et six semaines. Les résultats du deuxième protocole démontrent une augmentation de l'activité fibrinolytique à l'intérieur des glomérules rénaux. Malgré ces résultats encourageants, nous ne pouvions pas tirer de conclusion sur les mesures de ce seul paramètre.

Nous avons donc, durant cette même analyse immunohistochimique, étudié le PAI-1, un inhibiteur de la fibrinolyse. Nous avons choisi cet inhibiteur car des études ont démontré que chez des patients atteints de diverses pathologies rénales, une augmentation de PAI-1 est impliquée dans l'augmentation des dépôts de fibrine glomérulaire [40][43][44][46][47]. Une augmentation de PAI-1 semble diminuer l'activité fibrinolytique et augmenter les risques de thromboses [37][38][40][41][42][43][44][46][47][48]. Plusieurs auteurs arrivent à la conclusion que le PAI-1 joue un rôle majeur dans la persistance des dépôts de fibrine dans le

rein lors de conditions pathologiques [40][43][44][46][47]. En condition normale, les reins n'expriment pas cet inhibiteur [46][47]. Comme l'augmentation de PAI-1 semble en corrélation directe avec l'augmentation de fibrine dans le rein et qu'une augmentation de la fibrine est accompagnée d'une augmentation de TDP urinaires [67][68][69][70], une augmentation de PAI-1 pourrait indiquer une augmentation des TDP urinaires chez les athlètes utilisant la rHuEpo.

Selon les résultats présentés au tableau 6, nous notons que pour les traitements allant de deux à six semaines, il y a une augmentation du PAI-1 allant de 0 à + pour les traitements à la saline, à ++ pour les traitements de 50 U/Kg jusqu'à +++ pour les traitements de 1000 u/Kg. Pour ce qui est du traitement de six semaines, nous remarquons que le témoin a déjà ++ comme fluorescence. Ceci est probablement dû au fait que ce type de souris développe, entre l'âge de 24 à 48 semaines, une maladie rénale qui provoque l'augmentation de PAI-1 au niveau des glomérules [40][46] et que cette souris commençait à présenter des signes biologiques annonciateurs de cette pathologie.

Pour appuyer ces résultats immunohistochimiques, nous avons fait un dosage du PAI-1 par ELISA. Les résultats présentés au tableau 7 viennent confirmer chez les souris du deuxième protocole, une augmentation de la concentration de PAI-1 que se soit pour le traitement de deux, quatre ou six semaines. En effet, les témoins ont une faible concentration de PAI-1 dans leurs tissus alors qu'à mesure que nous augmentons la dose de rHuEpo, la

concentration de PAI-1 augmente. Cependant, nous notons que les concentrations en PAI-1 du protocole de deux semaines sont anormalement élevées en comparaison aux deux autres traitements dû au résultat discordant d'une des souris.

Tous les résultats obtenus semblent converger dans le même sens, c'est à dire qu'un traitement à la rHuEpo, tout dépendant de la durée et de la dose, fait augmenter la concentration de PAI-1 et légèrement celle de l'uPA chez les souris de type B/W de notre étude. Cette augmentation suggérerait une augmentation des dépôts de fibrine au niveau glomérulaire qui entraînerait une augmentation des TDP urinaires. Ce constat pourrait suggérer une explication sur l'origine des TDP urinaires retrouvés chez les athlètes d'endurance suspectés de se doper à la rHuEpo. En comparant nos résultats avec la littérature, nous constatons que les résultats divergent quant à l'effet de la rHuEpo sur le système fibrinolytique plasmatique. Certaines études réalisées chez des patients hémodialysés, affirment que la rHuEpo n'affecte pas la coagulation et la fibrinolyse [53][54][55] et une autre étude a démontré une augmentation de t-PA et une baisse de PAI-1[43]. D'autres études, faites sur des patients avec polycythémies, viennent suggérer le fait qu'une augmentation de l'hématocrite entraîne des risques plus élevés de thrombose [50][75][76] avec apparition dans certains cas de glomérulonéphrites avec dépôts de fibrine [75][77]. De plus, des études ont démontré que la rHuEpo entraînait, chez des patients hémodialysés, une augmentation des risques de thromboses [49][51] avec augmentation de la concentration du PAI-1 chez les

patients ayant développé une thrombose [52]. Malgré ces études contradictoires faites sur le plasma, nous croyons que nos résultats reflètent bien l'effet que peut avoir la rHuEpo sur l'activité des enzymes fibrinolytiques, soit une augmentation de celles-ci en réponse à une augmentation de la fibrine au niveau des glomérules.

La question qui se pose maintenant est à savoir si le PAI-1 et l'uPA sont augmentés à cause des dépôts de fibrine glomérulaire suite à une augmentation de l'hématocrite ou si cette augmentation est due à un effet de la rHuEpo elle-même sur les enzymes fibrinolytiques. Étant donné que la rHuEpo a comme fonction principale d'augmenter le taux de globules rouges dans le sang, nous croyons que ses effets sur la fibrinolyse intrarénale sont sûrement dus à l'augmentation de l'hématocrite et non à la rHuEpo elle-même, mais cette hypothèse reste quand même à vérifier. Suite à la vérification de cette hypothèse, il nous resterait à déterminer l'utilisation possible du dosage des TDP comme sonde pour détecter l'usage illicite de rHuEpo.

4.2 Conclusion

Ce travail de maîtrise a permis de suggérer que l'augmentation des TDP urinaires observés en présence d'Epo exogène puisse chez la souris, et peut-être chez l'homme, provenir d'une formation intrarénale de TDP suite à une modification de la fibrinolyse rénale et plus particulièrement suite à une augmentation du PAI-1 et de l'uPA au niveau des glomérules.

Il reste maintenant à approfondir le mécanisme d'action de l'Epo sur les enzymes fibrinolytiques. Le PAI-1 augmente-t-il directement à cause de l'Epo ? Augmente-t-il à cause de la croissance du taux de globules rouges qui entraînerait des dommages à l'endothélium, créant ainsi des microthrombi, une activation de la coagulation et de la fibrinolyse, pour ainsi faire augmenter le PAI-1 et l'uPA indirectement ? Pour vérifier ce mécanisme, il faudrait répéter le même type d'expérience mais cette fois avec un autre inducteur que la rHuEpo pour faire augmenter l'hématocrite des souris. Nous pourrions placer les souris en hypoxie et ainsi vérifier si c'est l'Epo exogène qui provoque l'augmentation des TDP ou si c'est secondaire à l'augmentation d'hématocrite.

RÉFÉRENCES

1. Porter, D.L., Goldberg, M.A., Physiology of erythropoietin production. Seminars in Hematology, 1994, vol 31, no 2, p.112-121.
2. Jelkmann, W., Erythropoietin : structure, control of production an function. Physiological Review, 1992, vol. 72, no. 2, p. 449-473.
3. Varet, B. Casadevall, N., Lacombe, C., L'érythropoïétine. Médecine et Science, 1988, vol. 4, p. 366-372.
4. Lacombe, C. et all. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. Journal of Clinical Investigation, 1988, vol. 81, p. 620-623.
5. Koury, S.T., Bondurant, M.S., Koury, M.J., Localisation of erythropoietin synthesizing cells in murine kidney by in situ hybridization. Blood, 1988, vol. 71, p. 524-527.

6. Shankz, J.H., et all, Localisation of erythropoietin gene expression in proximal renal tubular cells detected by digoxigenin-labelled oligonucleotide probes. Journal of Pathology, 1996, vol. 179, p. 283-287.
7. Abels, R., Review of hematologic effects of erythropoietin. Seminars in Nephrology, 1990, vol. 10, no.2, p. 1-10.
8. Fisher, J.W., Nakashima, J., The role of hypoxia in renal production of erythropoietin. Cancer supplement, 1992, vol. 70, no. 4, p. 928-939.
9. Eckardt, K.U., Kurtz, A., Bauer, C., Regulation of erythropoietin production is related to proximal tubular function. American Physiological Society, 1989, p. F942-F947.
10. Kurtz, A., Eckart, K.U., Tannabell, L., Regulation of erythropoietin production. Contribution to Nephrology, 1988, vol. 66, p. 1-16.
11. Nijhof, W., de Haan, G., Pietens, J., Dontje, B., Mechanistics options of erythropoietin-stimulated erythropoiesis. Experimental Hematology, 1995, vol. 23, p. 369-375.
12. Human recombinant erythropoietin. PJB Publication Ltd. Juillet 1989.

13. Lacombe, C., Erythropoïétine : Anticorps naturels et nouvelles indications. Medecine/Science, 1996, vol. 12, p. 1005-1006.
14. Souccar, T., Le sacre du dopage. Sciences et avenir, 1996, p. 44-58.
15. Gareau, R., Brisson, G., Ayotte, C., Audran, M., Chanal, J.L., A possible approach to erythropoietin doping detection. Second International Symposium on drugs in sports, 1994, p. 141-151.
16. Duvallet, A., Cayla, J.L., Audran, M., Gareau, R., Oxygène dopant. Pour la Science, 1996, vol. 225, p. 51.
17. Deacon, J., A phantom killer. Sports, 1995, p. 58.
18. Duvallet, A. Gareau, R., L'érythropoïétine : de la physiologie aux abus. Médecine/Science, 1996, vol. 12, p. 1004.
19. Flaharty, K.K., Grimm, A.M., Vlasses, P.H., Epoetin : human recombinant erythropoietin. Clinical Pharmacology, 1989, vol. 8, p. 769-779.
20. Gareau, R., Gagnon, M.G., Thellend, C., Chénard, C., Audran, M., Chanal, J.L., Ayotte, C., Brisson, G.R., Transferrin soluble receptor : A possible probe

- for detection of erythropoietin abuse by athletes. Hormone Metabolism Research, 1994, vol. 26, p. 311-312.
21. Gareau, R., Audran, M., Baynes, R.D., Flowers, C.H., Duvallet, A., Senecal, L., Brisson, G.R., Erythropoietin abuse in athletes. Nature, 1996, vol. 380, p. 113.
22. Gareau, R., Brisson, G.R., Ayotte, C., Dubé, J., Caron, C., Erythropoietin doping in athlete : possible detection through measurement of fibrinolytic products. Thrombosis and Haemostasis, 1992, vol. 68, no. 4, p. 481-482.
23. Gareau, R. Gagnon, M.G., Ayotte, C., Chénard, C., Brisson, G.R., rhuEpo increases urinary excretion of fibrin degradation products in hemodialysed patients. Thrombosis and haemostasis, 1993, vol. 70, no. 2, p. 373-374.
24. Gareau, R., Brisson, G.R., Chénard, C., Gagnon, M.G., Audran, M., Total fibrin and fibrinogen degradation products in urine. A possible probe to detect illicit users of the physical performance enhancer erythropoietin. Hormone Research, 1995, vol. 44, p. 189-192.
25. Gagnon, M.G., Exploration des mécanismes fibrinolytiques lors d'utilisation illicite d'érythropoïétine. Mémoire publié. INRS santé, 1995.
26. Caen, J., Tobelem, G., Soria, C., Fibrinolyse et Thrombolyse. New York :

édition Masson, 1986.

27. Jobin, F., La Thrombose. Québec :édition Maloine, 1995.
28. Jobin, F., L'Hémostase. Québec : édition Maloine, 1995.
29. Madhani, J., Movsowitz, H., Kothler, M.N., Tissue plasminogen activator (t-PA). Therapeutic drug monitoring, 1993, vol. 15, p. 546-551.
30. Brunner, G., Simon, M.M., Kramer, M.D., Activation of pro-urokinase by human T-cell associated serine proteinase HUTSP-1. FEBS Letters, 1990, vol. 261, p. 141-144.
31. Blasi, F., Vassali, J.D., Dano, K., Urokinase-type plasminogen activator : proenzyme, receptor and inhibitors. The Journal of Cell Biology, 1987, vol. 104, p. 801-804.
32. Falcone, D.J., McCaffrey, T.A., Haimovitz-Friedman, A., Vergilio, J.A., Nicholson, A.C., Macrophage and foam cell release of matrix-bound growth factors. The Journal of Biological Chemistry, 1993, vol. 268, no. 16, p. 11951-11958.

33. Estreicher, A., Mühlhauser, J., Carpentier, J.L., Orci, L., Vassalli, J.D., The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promote degradation of enzyme inhibitor complexe. The Journal of Cell Biology, 1990, vol. 111, p. 783-792.
34. Ci-Jiang, H.E., Peraldi, M.N., Adida, C., Rebibou, J.M., Meulders, Q., Sraer, J.D., Rondeau, E., Thrombin signal transduction mechanisms in human glomerular epithelial cells. Journal of Cellular Physiology, 1992, vol. 150, p. 475-483.
35. van Hinsberg, W.M., van der Berg, E., Fiers, W., Dooijewaard, G., Tumor necrosis induces the production of urokinase type plasminogen activator by human endothelial cells. Blood, vol. 75, no. 10, p. 1991-1998.
36. van Meijer, M., Pannekoek, H., Structure of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI- 1) and its function in fibrinolysis : an update. Fibrinolysis, 1995, vol.9, p. 263-276.
37. Wiman, B., Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma, its role in thrombotic disease. Thrombosis and Hemostasis, 1995, vol. 74, no.1, p. 71-76.

38. Carmelliet, P., Stassen, J.M., Schoonjans, L., Ream, B., van den Oord, J., de Mol, M., Mulligan, R., Collen, D., Plasminogen activator inhibitor 1 gene-deficient mice. Journal of Clinical Investigation, 1993, vol. 92, p. 2756-2760.
39. Lijnen, R., Van Hoef, B., Collen, D., Characterization of the murine plasminogen/urokinase type plasminogen activator system. European Journal of Biochemistry, 1996, vol. 241, p. 840-848.
40. Moll, S., Menoud, P.A., Fulpius, T., Pastore, Y., Takahashi, S., Fossati, L., Vassali, J.D., Sappino, A.P., Shifferli, J., Izui, S., Induction of plasminogen activator inhibitor type 1 in murine lupus like glomerulonephritis. Kidney International, 1995, vol. 48, p. 1459-1468.
41. Robbie, L., Bennet, B., Croll, A., Brown, P., Booth, N., Proteins of the fibrinolytic system in human thrombi. Thrombosis and Haemostasis, 1996, vol. 75, p. 127-133.
42. Paloma, M.J., Paramo, J.A., Rocha, E., Endotoxin-induced intravascular coagulation in rabbits : effect of tissue plasminogen activator vs urokinase on PAI-1 generation, fibrin deposits and mortality. Thrombosis and Haemostasis, 1995, vol. 74, p. 1578-1582.
43. Nakamura, T., Tahaka, N., Higuma, N., Nazama, T., Kobayashi, T., Yokota, S., The localization of plasminogen activator inhibitor 1 in glomerular subepithelial

- deposits in membranous nephropathy. Journal of American Society of Nephrology, 1996, vol. 7, no. 11, p. 2434-2444.
44. Keeton, M., Ahn, C., Eguchi, Y., Burligame, R., Loskutoff, D., Expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in renal tissue murine lupus nephritis. Kidney International, 1995, vol. 47, p. 148-157.
45. Colucci, M., Zoja, C., Remuzzi, G., Semeraro, N., Reduced fibrinolytic activity in glomeruli isolated from rabbit infused with tumor necrosis factor. Haemostasis, 1993, vol. 23, p. 173-178.
46. Troyer, D.A., Chandrasekar, B., Thinnies, T., Stone, A., Loskutoff, D.J., Fernandes, G., Effects of energy intake on type 1 plasminogen activator inhibitor levels in glomeruli of lupus prone B/W mice. American Journal of Pathology, 1995, vol. 146, no. 1, p. 111-120.
47. Rondeau, E., Mougenot, B., Lacave, R., Peraldi, M.N., Kruithof, E.K.O., Sraer, J.D., Plasminogen activator inhibitor-1 in renal fibrin deposits of human nephropathies. Clinical Nephrology, 1990, vol. 33, no. 2, p. 55-60.
48. Barnes, J.L., Mitchell, R.J., Torres, E.S., Expression of PAI-1 during cellular remodelling in proliferative glomerulonephritis in the rat. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1995, vol. 43, no. 9, p. 895-905.

49. Churchill, D.N., Muirhead, N., Goldstein, M., Posen, G., Fay, W., Beecroft, M.L., German, J., Taylor, D.W., Probability of thrombosis of vascular access among hemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. Journal of American Society of Nephrology, 1994, vol. 4, no. 10, p. 1809-1813.
50. Schafer, A., Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. Blood, 1984, vol. 64, no. 1, p. 1-12.
51. Taylor, J.E., Belch, J.J., McLaren, M., Henderson, I.S., Stewart, W.K., Effect of erythropoietin therapy and withdrawal on blood coagulation and fibrinolysis in hemodialysis patients. Kidney International, 1993, vol. 44, no. 1, p. 182-190.
52. Wirtz, M.J., van Esser, W.J., Hamulyak, K., Leunissen, K.M.L., van Hoof, J.P., The effect of recombinant human erythropoietin on hemostasis and fibrinolysis in hemodialysis patients. Clinical Nephrology, 1992, vol. 38, no. 5, p. 277-282.
53. Stenver, D., Jeppesen, L., Nielsen, B., Dalsgaard-Nielsen, J., Haedersdal, C., Mehlsen, J., Winther, K., The effect of erythropoietin on platelet function and fibrinolysis in chronic renal failure. International Journal of Artificial Organs, 1994, vol. 17, no. 3, p. 141-145.

54. Kaizu, K., Uriu, K., Eto, S., Effects of recombinant erythropoietin (EPOCH) on the coagulation and fibrinolysis systems and platelet functions in pre-dialysed patients with chronic renal failure. Japanese Journal of Nephrology, 1993, vol. 35, no. 8, p. 103-111.
55. Biesma, D.H., Bronkorst, P.J.H., de Groot, P.G., van de Wiel, A., Kraaijenhagen, R.J., Marx, J.J.M., The effect of recombinant human erythropoietin on hemostasis, fibrinolysis and blood rheology in autologous donors. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1994, vol. 124, no. 1, p. 42-47.
56. Bourey, R.E., Santoro, S.A., Interactions of exercise, coagulation, platelets and fibrinolysis - a brief review. Medecine and Sciences in Sports and Exercises, 1988, vol. 220, no. 5, p. 439-446.
57. Rankinen, T., Välsänen, S., Penttilä, I., Rauramaa, R., Acute dynamic exercise increase fibrinolytic activity. Thrombosis and Haemostasis, 1995, vol. 73, no. 2, p. 281-286.
58. Dooijewaard, G., de Boer, A., Turion, P.N.C., Cohen, A.F., Breimer, D.D., Kluft, C., Physical exercise induces enhancement of urokinase type plasminogen activator (u-PA) levels in plasma. Thrombosis and Haemostasis, 1991, vol. 65, no. 1, p. 82-86.

59. Szymanski, L.M., Pate, R.R., Fibrinolytic response to moderate intensity exercise : Comparaison of physically active and inactive men. Artherosclerosis and Thrombosis, 1994, vol. 14, no. 11, p. 1746-1750.
60. van den Burg, P.J.M., Dooijewaard, G., van Vliet, M., Mosterd, W.L., Kluft, C., Huisveld, I.A., Difference in u-PA and t-PA increase during acute exercise :Relation with exercise parameters. Thrombosis and Haemostasis, 1994, vol. 71, no. 2, p. 236-239.
61. Streiff, M., Bell, W.R., Exercise and hemostasis in humans. Seminars in Hematology, 1994, vol. 31, no. 2, p. 155-165.
62. Arai, M., Yorifuji, H., Ikematsu, I. , Nagasawa, H., Fujimaki, M., Fukutake, K., Katsumura, T., Ishiu, T., Iwane, H., Influence of strenuous exercise (triathlon) on blood coagulation and fibrinolytic system. Thrombosis and Haemostasis, 1990, vol. 57, p. 465-471.
63. Kanalas, J.J., Analysis of the plasminogen system on rat glomerular epithelial cells. Experimental Cell Research, 1995, vol. 218, p. 561-566.
64. Wagner, S.N., Atkinson, M.J., Wagner, C., Höfler, H., Schmitt, M., Wilhelm, O., Sites of urokinase type plasminogen activator expression and distribution of its

- receptor in the normal human kidney. Histochemistry Cellular Biology, 1996, vol. 105, p. 53-60.
65. Sappino, A.P., Huarte, J., Vassali, J.D., Belin, D., Site of synthesis of urokinase and tissue type plasminogen activators in the murine kidney. Journal of Clinical Investigation, 1991, vol. 87, p. 962-970.
66. Angles-Cano, E., Rondeau, E., Delarue, F., Hegege, J., Sultan, Y., Sraer, J.D., Identification and cellular localisation of plasminogen activators from human glomeruli. Thrombosis and Haemostasis, 1985, vol. 54, no. 3, p. 688-692.
67. Sakakibara, K., Nagase, M., Takada, Y., Takada, A., Relationship between urinary fibrinogen degradation products and various types of chronic nephritis. Thrombosis Research, 1987, vol. 45, p. 403-411.
68. Clarkson, A.R., MacDonald, M.K., Petrie, J.J.B., Cash, J.D., Robson, J.S., Serum and urinary fibrin/fibrinogen degradation products in glomerulonephritis. British Medical Journal, 1971, vol. 3, p. 447-451.
69. Shibata, T., Magari, Y., Perparim, K., Sumie, A., Ishii, T., Tomo, T., Sato, J., Yasumori, R., Nasu, M., Significance of urinary fibrin/fibrinogen degradation products in renal diseases measured by a highly sensitive ELISA. Nephron, 1995, vol. 69, p. 54-58.

70. Ekberg, M., Pandolfi, M., Origin of urinary fibrin/fibrinogen degradation products in glomerulonephritis. British Medical Journal, 1975, vol. 2, p. 17-19.
71. Kitching, A.B., Holdworth, S.K., Ploplis, V.A., Plow, E.F., Collen, D., Carmeliet, P., Tipping, P.G., Plasminogen and plasminogen activators protect against renal injury in crescentic glomerulonephritis. Journal of Experimental Medicine, 1997, vol. 185, no. 5, p. 963-968.
72. Declerk, P. J., Verstreken, M., Collen, D., Immunoassay of murine t-PA, u-PA and PAI-1 using monoclonal antibodies raised in gene-inactivated mice. Thrombosis and Haemostasis, 1995, vol. 74, no. 5, p. 1305-1309.
73. Sandermann, H., Streminger, J., Purification and properties of C₅₅-isoprenoid alcohol phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. Journal of Biological Chemistry, 1972, vol. 247, no 5, p.5123-5131.
74. Laemli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, vol. 227, p. 680-684.
75. Plomley, R.F., Sullivan, J.R., Whitworth, J.A., Kincaid-Smith, P.S., Fairlay, K.F., Brown, R.W., Polycythemia vera and glomerulonephritis. Australian and New Zealand Journal of Medicine, 1983, vol 13, p. 125-129.

76. Orlandi, E., Castelli, G., Brusamolino, E., Canevari, A., Morra, E., Lazzarino, M., Bernasconi, C., Hemorrhagic and thrombotic complications in polycythemia vera. A clinical study. Haematologica, 1989, vol. 74, p. 45-49.
77. Vassali, P., Simon, G., Rouiller, C., Electron microscopy study of glomerular lesions resulting from intravascular fibrin formation. American Journal of Pathology, 1963, vol. 43, p. 579-617.